



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년11월02일
(11) 등록번호 10-0991644
(24) 등록일자 2010년10월27일

- (51) Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2004-7002289
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2002년08월19일
심사청구일자 2007년08월17일
- (85) 번역문제출일자 2004년02월16일
- (65) 공개번호 10-2004-0036714
- (43) 공개일자 2004년04월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2002/026468
- (87) 국제공개번호 WO 2003/015711
국제공개일자 2003년02월27일
- (30) 우선권주장
60/313,273 2001년08월17일 미국(US)
60/393,952 2002년07월03일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
WO2001022972 A2*
US06339068 B1*
US06429199 B1*
WO2001055370 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
콜리 파마슈티칼 게엠베하
독일 40225 뒤셀도르프 메로빙거플라츠 1아
유니버시티 오브 아이오와 리써치 파운데이션
미국 아이오와 아이오와 시티 유니버시티 캠퍼스
센터 2660 아이오와 센터스 포 엔터프라이즈 (우: 52242-5500)
- (72) 발명자
크리그, 아서, 엠.
미국02481메사추세츠주웰즐리원당리버로드173
폴머, 요르그
독일40591뒤셀도르콜라우슈백24
울만, 오이겐
독일40764랑겐펠트엘리자베트-젤베르트-스트라세
콜리파마슈티칼게엠베하
- (74) 대리인
장수길, 김영

전체 청구항 수 : 총 59 항

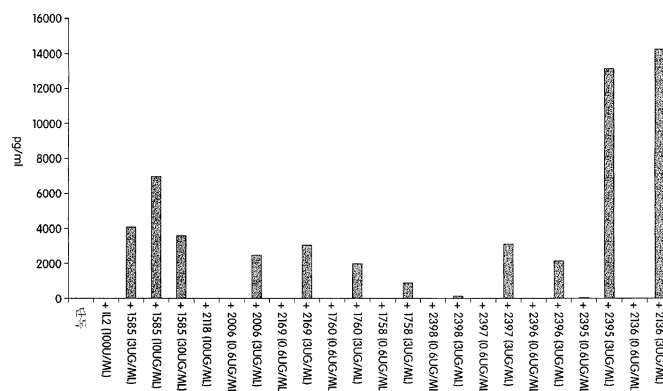
심사관 : 김정희

(54) 활성이 개량된 조합 모티프 면역자극성 올리고뉴클레오티드

(57) 요약

본 발명은 2개 이상의 기능적 및 구조적으로 한정된 도메인을 갖는 일 부류의 면역자극성 핵산을 제공한다. 이 부류의 조합 모티프 면역자극성 핵산은 면역 반응을 활성화시키며 다양한 면역 관련 질환, 예컨대 암, 감염 질환 및 알레르기성 질환의 치료에 유용하다. 본 발명의 핵산은 또한 자연 살해 세포의 활성화와 제1형 인터페론의 생산을 자극한다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

하기 식:

5' PX_1DCGHX_2 3' 또는 5' X_1DCGHX_2P 3'

을 포함하는 염기 서열을 갖고,

식 중, X_1 및 X_2 는 독립적으로 0 내지 10개 염기 길이의 임의의 서열이고, D는 C 이외의 염기이며, C는 시토신이고, G는 구아닌이며, H는 G 이외의 염기이고, P는 길이가 10개 염기 이상인 GC-풍부 팔린드롬 포함 서열이며, 여기서

- a) H는 티민(T)이며, X_2 는 CGTTT 또는 CGTTTT이고,
- b) P는 완전히 팔린드롬이고, H는 T이며, X_2 는 CG, CGT, CGTT, CGTTT 및 CGTTTT로 이루어진 군으로부터 선택되고(되거나),
- c) P는 하나 이상의 하이포잔틴(hypoxanthine)(I)을 포함하는 것인, 14 내지 100개 뉴클레오티드 길이의 면역자극성 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 염기 서열이

- a) 5' $X_1DCGHX_2PX_3$ 3'(여기서, X_3 은 0 내지 10개 염기 길이의 임의의 서열임),
- b) 5' $X_1DCGHPX_3$ 3'(여기서, X_3 은 0 내지 10개 염기 길이의 임의의 서열임),
- c) 5' $DCGHX_2PX_3$ 3'(여기서, X_3 은 0 내지 10개 염기 길이의 임의의 서열임),
- d) 5' $TCGHX_2PX_3$ 3'(여기서, X_3 은 0 내지 10개 염기 길이의 임의의 서열임),
- e) 5' $DCGHPX_3$ 3'(여기서, X_3 은 0 내지 10개 염기 길이의 임의의 서열임), 및(또는)
- f) 5' $DCGHP$ 3'

를 포함하는 것인 면역자극성 핵산.

청구항 3

하기 식:

5' NX_1DCGHX_2 3' 또는 5' X_1DCGHX_2N 3'

을 포함하는 염기 서열을 갖고,

식 중, X_1 및 X_2 는 독립적으로 0 내지 10개 염기 길이의 임의의 서열이고, D는 C 이외의 염기이며, C는 시토신이고, G는 구아닌이며, H는 G 이외의 염기이고, N은 CGG로 시작하고 길이가 10개 염기 이상인 B-세포 중화 서열이며, 여기서

- 1) 5' NX_1DCGHX_2 3'에 대하여:
 - a) H는 티민(T)이고(이거나),
 - b) H는 T이며, X_2 는 CG, CGT, CGTT, CGTTT 및 CGTTTT로 이루어진 군으로부터 선택되고,
- 2) 5' X_1DCGHX_2N 3'에 대하여:

a) H는 T이며, X₂는 CGTTTT인,

14 내지 100개 뉴클레오티드 길이의 번역자극성 핵산.

청구항 4

제1항에 있어서, 식 5' PX₁DCGHX₂ 3' 및 5' X₁DCGHX₂P 3'에서 C가 메틸화되지 않은 것인 번역자극성 핵산.

청구항 5

제3항에 있어서, 식 5' NX₁DCGHX₂ 3' 및 5' X₁DCGHX₂N 3'에서 C가 메틸화되지 않은 것인 번역자극성 핵산.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 뉴클레아제-저항성 골격을 갖고(갖거나),
- b) 포스포로티오에이트 골격을 갖고(갖거나),
- c) 키메라 골격을 갖고(갖거나),
- d) 길이가 14-40개 뉴클레오티드이고(이거나),
- e) 길이가 14-30개 뉴클레오티드인,

번역자극성 핵산.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 염기 서열이 5' 말단 및(또는) 3' 말단에 폴리-T 서열을 추가로 포함하는 번역자극성 핵산.

청구항 8

제6항에 있어서, 염기 서열이 5' 말단 및(또는) 3' 말단에 폴리-T 서열을 추가로 포함하는 번역자극성 핵산.

청구항 9

하기 식:

5' N₁PyGN₂P 3'

을 포함하는 염기 서열을 갖고,

식 중, N₁은 1 내지 6개 염기 길이의 임의의 서열이고, Py는 피리미딘이며, G는 구아닌이고, N₂는 0 내지 30개 염기 길이의 임의의 서열이며, P는 길이가 10개 염기 이상인 GC-풍부 팔린드롬 포함 서열이고, 여기서 N₁은

- a) 하나 이상의 시토신-하이포잔틴(CI) 모티프를 포함하고(하거나),
- b) 하나 이상의 TCI 모티프를 포함하고(하거나),
- c) 하나 이상의 IG 모티프를 포함하고(하거나),
- d) 하나 이상의 TIG 모티프를 포함하고(하거나),
- e) TCGG인,

13 내지 100개 뉴클레오티드 길이의 번역자극성 핵산.

청구항 10

제9항에 있어서,

- a) Py가 메틸화되지 않은 C이고(이거나),

- b) N₂의 50% 이상이 피리미딘이고(이거나),
 - c) N₂의 50% 이상이 T이고(이거나),
 - d) N₂가 폴리-G 또는 폴리-A 모티프를 포함하지 않고(않거나),
 - e) N₁PyGN₂가 TTTCG, TTTTCG, TTTTTCG, TTCGT 및 TTTCGT로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열인,
- 면역자극성 핵산.

청구항 11

제9항에 있어서,

- a) 완전히 뉴클레아제-저항성 골격을(임의로, 뉴클레아제-저항성 골격은 포스포로티오에이트 연결부로 이루어짐)을 갖고(갖거나),
- b) 완전히 포스포디에스테르 골격을 갖고(갖거나),
- c) 키메라 골격을 갖는,

면역자극성 핵산.

청구항 12

제9항에 있어서, P가

- a) 완전히 팔린드롬이고(이거나),
- b) 1 내지 3개의 연속되는 개재 염기를 갖는 팔린드롬 서열이고(이거나),
- c) 3개 이상의 C 및 3개 이상의 G 염기를 포함하고(하거나),
- d) 4개 이상의 C 및 4개 이상의 G 염기를 포함하고(하거나),
- e) 5개 이상의 C 및 5개 이상의 G 염기를 포함하고(하거나),
- f) 하나 이상의 하이포잔틴을 포함하는 것인,

면역자극성 핵산.

청구항 13

제9항에 있어서,

- a) 13 내지 40개 뉴클레오티드 길이이고(이거나),
- b) 13 내지 30개 뉴클레오티드 길이인,

면역자극성 핵산.

청구항 14

하기 식:

5' N₁PyG/IN₂P 3'

을 포함하는 염기 서열을 갖고,

식 중, N₁은 1 내지 6개 염기 길이의 임의의 서열이고, Py는 피리미딘이며, G/I는 G 또는 I인 단일 염기를 나타내고, G는 구아닌이며, I는 하이포잔틴이고, N₂는 0 내지 30개 염기 길이의 임의의 서열이며, P는 길이가 10개 염기 이상인 팔린드롬 포함 서열이고, 여기서 G/I가 G일 때, P는 IC-풍부 팔린드롬인,

13 내지 100개 뉴클레오티드 길이의 면역자극성 핵산.

청구항 15

제14항에 있어서, G/I가 I일 때

a) N₁PyIN₂가 TCITCITTTT(서열 47)이고(이거나),

b) P가 GC-풍부 팔린드롬이고(이거나),

c) P가 IC-풍부 팔린드롬인,

면역자극성 핵산.

청구항 16

제14항에 있어서, 13 내지 30개 뉴클레오티드 길이인 면역자극성 핵산.

청구항 17

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 면역자극성 핵산과 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 18

제6항에 따른 면역자극성 핵산과 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 19

제7항에 따른 면역자극성 핵산과 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 20

제8항에 따른 면역자극성 핵산과 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 21

제17항에 있어서, 항원, 임의로 종양 항원을 추가로 포함하는 제약 조성물

청구항 22

제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포를 제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, 제1형 IFN의 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법.

청구항 23

제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포를 제6항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, 제1형 IFN의 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법.

청구항 24

제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포를 제7항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, 제1형 IFN의 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법.

청구항 25

제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포를 제8항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, 제1형 IFN의 발현을 유도하기 위한 시험관내 방법.

청구항 26

자연 살해(NK) 세포를 제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, NK 세포를 활성화하기 위한 시험관내 방법.

청구항 27

자연 살해(NK) 세포를 제6항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, NK 세포를 활성화하기 위한 시험관내 방법.

청구항 28

자연 살해(NK) 세포를 제7항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, NK 세포를 활성화하기 위한 시험관내 방법.

청구항 29

자연 살해(NK) 세포를 제8항에 따른 면역자극성 핵산과 접촉시키는 것을 포함하는, NK 세포를 활성화하기 위한 시험관내 방법.

청구항 30

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포와 접촉시켜 제1형 IFN의 발현을 유도하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 31

제6항에 있어서, 제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포와 접촉시켜 제1형 IFN의 발현을 유도하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 32

제7항에 있어서, 제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포와 접촉시켜 제1형 IFN의 발현을 유도하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 33

제8항에 있어서, 제1형 인터페론(IFN)을 발현할 수 있는 세포와 접촉시켜 제1형 IFN의 발현을 유도하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 34

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 자연 살해(NK) 세포와 접촉시켜 NK 세포를 활성화하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 35

제6항에 있어서, 자연 살해(NK) 세포와 접촉시켜 NK 세포를 활성화하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 36

제7항에 있어서, 자연 살해(NK) 세포와 접촉시켜 NK 세포를 활성화하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 37

제8항에 있어서, 자연 살해(NK) 세포와 접촉시켜 NK 세포를 활성화하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 38

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 감염증을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 39

제6항에 있어서, 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 감염증을 치료 또는 예방하는 것을 포함하

는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 40

제7항에 있어서, 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 감염증을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 41

제8항에 있어서, 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 감염증을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 42

제38항에 있어서, 대상이 바이러스, 세균, 진균 및 기생충 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 것인, 면역자극성 핵산.

청구항 43

제39항에 있어서, 대상이 바이러스, 세균, 진균 및 기생충 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 것인, 면역자극성 핵산.

청구항 44

제40항에 있어서, 대상이 바이러스, 세균, 진균 및 기생충 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 것인, 면역자극성 핵산.

청구항 45

제41항에 있어서, 대상이 바이러스, 세균, 진균 및 기생충 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 것인, 면역자극성 핵산.

청구항 46

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 알레르기성 질환에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 알레르기성 질환을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 47

제6항에 있어서, 알레르기성 질환에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 알레르기성 질환을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 48

제7항에 있어서, 알레르기성 질환에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 알레르기성 질환을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 49

제8항에 있어서, 알레르기성 질환에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 알레르기성 질환을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 50

제46항에 있어서, 알레르기성 질환이 알레르기성 천식인 면역자극성 핵산.

청구항 51

제47항에 있어서, 알레르기성 질환이 알레르기성 천식인 면역자극성 핵산.

청구항 52

제48항에 있어서, 알레르기성 질환이 알레르기성 천식인 면역자극성 핵산.

청구항 53

제49항에 있어서, 알레르기성 질환이 알레르기성 천식인 면역자극성 핵산.

청구항 54

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 암에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 55

제6항에 있어서, 암에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 56

제7항에 있어서, 암에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 57

제8항에 있어서, 암에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 치료 방법에 사용하기 위한 면역자극성 핵산.

청구항 58

제54항에 있어서, 암이 기저세포암, 담도암, 방광암, 골암, 뇌 및 중추신경계암, 유방암, 자궁경부암, 흉모상피암, 결장 및 직장암, 결합조직 암, 소화기계암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 두부 및 경부암, 위암, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 백혈병, 간암, 폐암, 호지킨형 및 비호지킨형 림프종을 포함한 림프종, 흑색종, 골수종, 신경아종, 구강암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 망막모세포종, 횡문근육종, 직장암, 신장암, 호흡기계암, 육종, 피부암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 비뇨기계암, 및 기타 암종 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 면역자극성 핵산.

청구항 59

TCGTCGTTTTCGGCGCGCCG (서열 1),
 TCGTCGTTTTCGGCGGCCCG (서열 4),
 TCGTCGTTTTCGGCGCCCG (서열 5),
 TCGTCGTTTTCGGCGCCGCG (서열 6),
 TCGTCGTTTTCGGCCCGCGG (서열 7),
 TCGTCGTTTTCGGCGCGCCGTTTT (서열 12),
 TCCTGACGTTGCGCGCGCCG (서열 13),
 TZGTZGTTTTZGZGZGZGZG (서열 14)(여기서, Z는 5-메틸시토신임), 또는
 TCGGCGCGCCGTCGTCGTTT (서열 11)

을 포함하는 염기 서열을 갖는 면역자극성 핵산.

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 개괄적으로는 면역자극성 핵산, 그 조성물 및 그 면역자극성 핵산을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 면역자극 활성 프로필이 서로 다른 2가지 주된 부류의 면역자극성 서열이 이 기술분야에 공지되어 있다 [Krieg AM (2001) Trends Microbiol 9:249-52]. 이것들은 강력한 B 세포 활성화제인 소위 클래스 B CpG 올리고뉴클레오타이드 (ODN)와 강력한 자연 살해 세포 (NK cell) 활성화제인 클래스 A CpG ODN이다. 이들 면역자극성 서열 외에, 적어도 두 부류의 중화 서열이 알려져 있는데, 여기에는 CG의 앞에 C가 오거나 뒤에 G가 오는 CpG 서열 (Krieg AM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:12631-12636), 및 CG가 메틸화되어 있는 DNA 서열이 포함된다. 중화 모티프는 다른 면에서는 비자극성인 모티프 내에 존재하면 어느 정도의 면역자극능을 갖지만

다른 면역자극성 모티프와 관련하여 존재하는 경우에는 그 다른 모티프의 면역자극 포텐셜을 저하시키는 역할을 하는 모티프이다.

[0003] <발명의 요약>

[0004] 본 발명에서는 새로운 부류의 면역자극성 핵산을 제공한다. 어떤 경우에는 이들 핵산은 CG-풍부 팔린드롬 (palindrome) 또는 CG-풍부 중화 모티프를 가진다. 본 출원인은 이전에 CGCGCG와 같은 CG 서열의 반복 또는 CG 디뉴클레오타이드의 앞에 C가 있고(있거나) (즉, CCG) 뒤에 G가 오는 (즉, CCG, CCGG) 것으로 이루어진 중화 모티프를 포함하고 있는 올리고데옥시뉴클레오타이드 (ODN)을 알아내고 설명한 바 있다. 이들 중화 모티프는 IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α 의 분비 및 항원특이적 면역 반응의 유도과 같은 여러가지 신호전달에 대한 CpG 함유 ODN의 자극 효과에 다소의 저하를 초래하는 것으로 여겨졌다 [Krieg AM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:12631-6].

[0005] 본 발명은 부분적으로는, 자극 모티프와 중화 모티프의 조합을 포함하고 있는 특정 ODN이 고도로 면역자극성이라는 본 출원인들의 놀라운 발견에 기초하고 있다. 본 발명은 역시 부분적으로는, 중화 모티프를 담은 팔린드롬 서열을 비롯한 특정한 CG-풍부 팔린드롬 서열을 갖는 ODN이 고도로 면역자극성이라는 본 출원인들의 놀라운 발견에 기초하고 있다. 따라서 상기 중화 모티프는 고도로 면역자극성이기 위해 팔린드롬 서열구조 내에 존재할 수 있으나, 반드시 그래야 하는 것은 아니다.

[0006] 또한, 본 발명의 면역자극성 ODN은 이전까지 2가지의 구별되는 CpG ODN 부류, 즉 특징적으로 B 세포를 활성화시키는 것 (클래스 B CpG ODN)과 특징적으로 자연 살해 세포를 활성화시키고 인터페론 (IFN)- α 의 생산을 유도하는 것 (클래스 A CpG ODN) 양쪽에 연관시켜왔던 면역자극성 효과를 지닌다. 본 발명의 신규 면역자극성 ODN은 따라서 클래스 A CpG ODN 또는 클래스 B CpG ODN 어느 것보다 구별되는 면역자극성 효과의 스펙트럼을 보인다. 본 발명의 이 새로운 부류의 면역자극성 ODN을 타입 C CpG ODN이라 지칭한다. 아래에서 더 상세히 설명하는 바와 같이, 본 발명의 ODN의 일부 실시태양은 한 모티프는 CG-풍부 팔린드롬 또는 중화 모티프이고 다른 한 모티프는 자극 모티프, 예컨대 CpG 모티프 또는 서열 TCGTCG인 모티프 조합을 포함한다.

[0007] 일부 측면에서는 길이가 14 내지 100개 뉴클레오타이드인 면역자극성 핵산을 제공한다. 이 핵산의 식은 다음과 같다: 5' X₁DCGHX₂ 3'. X₁ 및 X₂는 각각 0 내지 10개 뉴클레오타이드 길이의 임의의 서열이다. D는 C 이외의 뉴클레오타이드이다. C는 시토신이다. G는 구아닌이다. H는 G 이외의 뉴클레오타이드이다. 상기 핵산 서열은 또한 P와 N으로 이루어진 군으로부터 선택되고 X₁의 바로 5'측 또는 X₂의 바로 3'측에 위치하는 핵산 서열을 포함한다. N은 CGG 트리뉴클레오타이드로 시작하고 길이가 10개 뉴클레오타이드 이상인 B-세포 중화 서열이다. P는 GC-풍부 팔린드롬 함유 서열로서 길이가 10개 뉴클레오타이드 이상이다.

[0008] 일부 실시태양에서, 면역자극성 핵산은 5' NX₁DCGHX₂ 3', 5' X₁DCGHX₂ N 3', 5' PX₁DCGHX₂ 3', 5' X₁DCGHX₂P 3', 5' X₁DCGHX₂ PX₃ 3', 5' X₁DCGHPX₃ 3', 5' DCGHX₂PX₃ 3', 5' TCGHX₂PX₃ 3', 또는 5' DCGHPX₃ 3'이다. X₃는 0 내지 10개 뉴클레오타이드 길이의 임의의 서열이다. 다른 실시태양에서는, 면역자극성 핵산은 5' DCGHP 3'이다.

[0009] 경우에 따라서는, D 및(또는) H는 티민 (T)이다.

[0010] 다른 실시태양에서, H는 T이고, X₂는 CG, CGT, CGTT, CGTTT, 또는 CGTTTT이다.

[0011] 다른 실시태양에 따르면 H는 T이고, X₂는 CG 또는 CGTTTT이다.

[0012] 다른 실시태양에 따르면 C는 메틸화되지 않은 것이다.

[0013] N은 일부 실시태양에서 4개 이상의 CG 디뉴클레오타이드를 함유하며 최대 2개의 CCG 트리뉴클레오타이드를 가진다.

[0014] 경우에 따라서는 P는 하나 이상의 이노신을 포함한다.

[0015] 본 발명의 핵산은 5' 말단 및 3' 말단에 폴리-T 서열을 포함할 수도 있다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면 길이가 13 내지 100개 뉴클레오타이드인 면역자극성 핵산이 제공된다. 이 핵산의 식은 다음과 같다: 5' N₁PyGN₂P 3'. G는 구아닌이다.

[0017] N₁은 1 내지 6개 뉴클레오타이드 길이의 임의의 서열이다. 일부 실시태양에서, N₁은 50% 이상이 피리미딘이고 바람직하게는 50% 이상이 T이다. 다른 일부 실시태양에서는 N₁은 하나 이상의 CG 모티프, 하나 이상의 TCG 모티

프, 하나 이상의 CI 모티프, 하나 이상의 TCI 모티프, 하나 이상의 IG 모티프, 또는 하나 이상의 TIG 모티프를 포함하고 있다. 다른 일부 실시태양에서 N_1 은 TCGG 또는 TCGH이다. H는 G 이외의 뉴클레오티드이다.

- [0018] Py는 피리미딘이다. 일부 실시태양에서 Py는 메틸화되지 않은 C이다.
- [0019] N_2 는 0 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 임의의 서열이다. 일부 실시태양에서, N_2 는 50% 이상이 피리미딘이거나 50% 이상이 T이다. 다른 일부 실시태양에서, N_2 는 폴리-G 또는 폴리-A 모티프를 전혀 포함하지 않는다.
- [0020] P는 길이가 10개 뉴클레오티드 이상인, GC-풍부 팔린드롬을 포함하고 있는 서열이다. 일부 실시태양에서 P는 완전히 팔린드롬이다. 다른 일부 실시태양에서는 P는 1 내지 3개의 연속되는 개재 뉴클레오티드가 있는 팔린드롬이다. 경우에 따라서는 이 개재 뉴클레오티드가 TG일 수 있다. 또다른 실시태양에서는 P가 적어도 3, 4, 또는 5개의 C와 적어도 3, 4, 또는 5개의 G 뉴클레오티드를 포함한다. 또다른 실시태양에 따르면, P는 하나 이상의 이노신을 포함한다.
- [0021] 한 실시태양에서, GC-풍부 팔린드롬의 염기 함량은 2/3 이상이 G 및 C이다. 다른 한 실시태양에서, GC-풍부 팔린드롬의 염기 함량은 81 % 이상이 G 및 C이다. 일부 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 길이가 12개 뉴클레오티드 이상이다. GC-풍부 팔린드롬은 완전히 C와 G만으로 이루어질 수도 있다. 일부 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 C도 아니고 G도 아닌 뉴클레오티드를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0022] 일부 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 하나 이상의 CGG 트리머, 하나 이상의 CCG 트리머, 또는 하나 이상의 CGCG 테트라머를 포함한다. 일부 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 4개 이상의 CG 디뉴클레오티드를 포함한다. 특정한 바람직한 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 중앙에 CG 디뉴클레오티드를 포함한다.
- [0023] 특정 실시태양에서는, GC-풍부 팔린드롬은 CGGCGCGGCCG (서열 23), CGGCGGCCGCCG (서열28), CGACGATCGTCG (서열 68) 또는 CGACGTACGTCG (서열 69)이다.
- [0024] 특정 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 CGCGCGCGCGCG (서열 29), GCGCGCGCGCGC (서열 30), CCCCCGGGGGG (서열 31), GGGGGCCCCC (서열 32), CCCCCGGGG (서열 33) 또는 GGGGGCCCC (서열 34)가 아니다.
- [0025] 일부 실시태양에서는 N_1PyGN_2 는 TTTTTCG, TCG, TTCG, TTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTCGT 및 TCGTCGT로 이루어진 군으로부터 선택된 서열이다.
- [0026] 본 발명의 다른 측면에 따르면 길이가 13 내지 100개 뉴클레오티드인 번역자극성 핵산이 제공된다. 이 핵산의 식은 다음과 같다: 5' N_1PyG/IN_2P 3'. G/I는 G 또는 I인 단일 뉴클레오티드를 말한다. G는 구아닌이고 I는 이노신이다.
- [0027] N_1 은 1 내지 6개 뉴클레오티드 길이의 임의의 서열이다. Py는 피리미딘이다. N_2 는 0 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 임의의 서열이다.
- [0028] P는 길이가 10개 뉴클레오티드 이상인 팔린드롬 포함 서열이다. 일부 실시태양에서는 P는 GC-풍부 팔린드롬이다. 다른 일부 실시태양에서는 P는 IC-풍부 팔린드롬이다.
- [0029] 일부 실시태양에서는 N_1PyIN_2 가 TCITCITTTT (서열 47)이다.
- [0030] 본 명세서에 기재된 핵산 분자들은 어떤 종류의 골격 조성을 가질 수 있다. 일부 실시태양에서는, 이들 번역자극성 핵산은 완전히 뉴클레아제-저항성 골격을 가진다. 뉴클레아제-저항성 골격은 포스포로티오에이트 연결부로 이루어질 수 있다. 다른 일부 실시태양에서는 번역자극성 핵산이 완전히 포스포디에스테르 골격을 가진다. 또다른 일부 실시태양에서는, 번역자극성 핵산이 키메라 골격을 가진다. 한 실시태양에서는 번역자극성 핵산이 CG, CI 또는 IG 모티프 사이에 하나 이상의 포스포디에스테르 연결부를 가진다. 이와 다른 경우로는, 본 발명의 ODN을 미소립자, 에멀전 또는 다른 수단과 배합하여 생체 내에서 빠른 분해를 피하도록 한다.
- [0031] 본 명세서에 기재된 번역자극성 핵산 분자는 길이가 다양하다. 일부 실시태양에서 본 발명의 번역자극성 핵산의 길이는 13-100, 13-40, 13-30, 14-100, 14-40, 또는 14-30개 뉴클레오티드이거나 그 사이의 임의의 정수이다.
- [0032] 다음의 서열을 갖는 번역자극성 핵산도 본 발명에 의해 제공된다: TCGTCGTTTTCGGCGCGGCCG (서열 1), TCGTCGTTTTCGGCGGCCGCCG (서열 4), TCGTCGTTTTCGGCGCGGCCG (서열 5), TCGTCGTTTTCGGCGCGGCCG (서열 6), TCGTCGTTTTCGGCCCGCGCG (서열 7), TCGTCGTTTTCGGCGCGCGCGTTTTT (서열 12), TCCTGACGTTCGGCGCGGCCG (서열

13), TZGTZGTTTTZGGZGZGZGZG (서열 14)(여기서, Z는 5-메틸시토신임), TCCTGACGTTTCGGCGCGCGCC (서열 19), TCGGCGCGCGCGCGCGCGTT (서열 11), TCCTGACGTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2136, 서열 19), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 5513, 서열 64), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 5514, 서열 65), TCGTCGTTTTTCGACGCGCGCGCC (ODN 5515, 서열 66) 및 TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCGTT (ODN 5516, 서열 67).

[0033] 또한 본 발명의 다른 일부 실시태양에 따르면 면역자극성 핵산은 다음 서열들 중 하나이다: TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2395), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2429), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCG (ODN 2430), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2431), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCG (ODN 2432), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCGTTTT (ODN 2452), TCCTGACGTTTCGGCGCGCGCC (ODN 5315), TZGTZGTTTTZGGZGZGZGZG (ODN 5327, 여기서 Z는 5-메틸시토신임), TCCTGACGTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2136), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGACG (ODN 5513), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 5514), TCGTCGTTTTTCGACGCGCGCGCC (ODN 5515), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCGTT (ODN 5516), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2395), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCGCC (ODN 2429), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCG (ODN 2430), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2431), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCG (ODN 2432), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCGTTTT (ODN 2452), TCCTGACGTTTCGGCGCGCGCC (ODN 5315), TZGTZGTTTTZGGZGZGZGZG (ODN 5327, 여기서 Z는 5-메틸시토신임), TCCTGACGTTTCGGCGCGCGCC (ODN 2136), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGACG (ODN 5513), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCC (ODN 5514), TCGTCGTTTTTCGACGCGCGCGCC (ODN 5515), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCGTT (ODN 5516), TCGGCGCGCGCGCGCGCGTT (ODN 2451), TCGTCGTTTTTCGACGCGCGCGTT (ODN 20173, 서열 71), TCGTCGTTTTTCGACGATCGTCG (ODN 20176, 서열 72), TCGTCGTTTTTCGACGTACGTCG (ODN 20177, 서열 73), TCGTCGCGACGCGCGTT (ODN 20178, 서열 74), TCGTCGCGACGATCGTCG (ODN 20179, 서열 75), TCGTCGCGACGTACGTCG (ODN 20180, 서열 76), TCGTTTTTTTCGACGCGCGTT (ODN 20184, 서열 77), TCGTTTTTTTCGACGATCGTCG (ODN 20185, 서열 78) 및 TCGTTTTTTTCGACGTACGTCG (ODN 20186, 서열 79).

[0034] 특정 실시태양에 따르면, 면역자극성 핵산은 서열 TCGGCGCGCGCGCGCGTT (ODN 2451, 서열 11)를 포함한다. 특정 실시태양에서는 면역자극성 핵산이 서열 TCGGCGCGCGCGCGCGTT (ODN 2451)이다.

[0035] 본 발명의 다른 일면에 따르면 본 명세서에 기재된 면역자극성 핵산과 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

[0036] 본 발명의 다른 일면으로, 제1형 인터페론 (IFN) 발현을 유도하는 방법이 제공된다. 이 방법은 제1형 IFN을 발현할 수 있는 세포를 유효량의 본 명세서에 기재된 면역자극성 핵산과 접촉시켜 제1형 IFN의 발현을 유도하는 것을 포함한다.

[0037] 본 발명은 또다른 일면으로 자연 살해(NK) 세포를 활성화시키는 방법이다. 이 방법은 NK 세포를 유효량의 본 명세서에 기재된 면역자극성 핵산과 접촉시켜 NK 세포를 활성화시키는 것을 포함한다.

[0038] 또다른 일면으로, 본 발명은 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에게 유효량의 본 명세서에 기재된 면역자극성 핵산을 투여하여 감염증을 치료 또는 예방함으로써 감염증을 치료하는 방법이다. 일부 실시태양에서는 이 대상이 바이러스, 세균, 진균 및 기생충 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 감염증에 걸려 있거나 발병할 위험이 있다.

[0039] 특정 실시태양에서, 상기 방법은 본 발명의 면역자극성 핵산을 단독으로 투여하여 감염증을 치료 또는 예방하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서는 본 발명의 이 측면에 따른 방법은 대상에게 항세균제, 항바이러스제, 항진균제 또는 구충제일 수 있는 항생제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0040] 다른 일면으로, 본 발명은 알레르기성 질환에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에게 유효량의 본 명세서에 기재된 면역자극성 핵산을 투여하여 알레르기성 질환을 치료 또는 예방함으로써 알레르기성 질환을 치료하는 방법이다. 일부 실시태양에서는 상기 알레르기성 질환이 알레르기성 천식이다. 한 실시태양에서는 상기 알레르기성 질환이 천식이다. 특정 실시태양에서는 상기 방법은 본 발명의 면역자극성 핵산을 단독으로 투여하여 알레르기성 질환을 치료 또는 예방하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서는, 본 발명의 이 일면에 따른 방법은 대상에게 천식/알레르기 치료제, 에컨대 스테로이드, 항히스타민제 및 프로스타글란딘 유도제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0041] 본 발명의 다른 일면에 따르면 암을 치료하는 방법이 제공된다. 이 방법은 암에 걸려 있거나 발병할 위험이 있는 대상에게 유효량의 본 명세서에 기재된 면역자극성 핵산을 투여하여 암을 치료 또는 예방하는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서는 상기 암이 기저세포암, 담도암, 방광암, 골암, 뇌 및 중추신경계암, 유방암, 자궁경부암, 용모상피암, 결장 및 직장암, 결합조직암, 소화기계암, 자궁내막암, 식도암, 안암, 두부 및

경부암, 위암, 상피내 신생물, 신장암, 후두암, 백혈병, 간암, 간암, 폐암 (예컨대, 소세포 및 비소세포), 호지킨병 및 비호지킨형 림프종을 포함한 림프종, 흑색종, 골수종, 신경아종, 구강암 (예, 구순암, 설암, 구강암 및 인두암), 난소암, 췌장암, 전립선암, 망막모세포종, 횡문근육종, 직장암, 신장암, 호흡기계암, 육종, 피부암, 위암, 고환암, 갑상선암, 자궁암, 비뇨기계암, 및 기타 암종 및 육종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0042] 특정 실시태양에서는 본 발명의 방법은 본 발명의 면역자극성 핵산을 단독으로 투여하여 암을 치료하는 것을 포함한다. 특정 실시태양에서는 본 발명의 이 측면에 따른 방법은 대상자에게 항암 약물 또는 치료, 예컨대 화학요법제, 방사선을 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0043] 본 발명의 제한사항 각각은 발명의 여러가지 실시태양을 포괄할 수 있다. 따라서, 하나의 요소 또는 요소들의 조합이 관련된 발명의 제한 사항 각각을 본 발명의 각 측면에 포함시킬 수 있음을 예상할 수 있을 것이다.

발명의 상세한 설명

[0071] 본 발명은 2가지 이상의 서로 다른 모티프를 함유하고 있는 특정한 올리고데옥시뉴클레오티드 (ODN)이 면역계의 세포에 독특하고 바람직한 자극 효과를 가진다는 것을 밝혀내었다. 이러한 ODN 중 일부는 전통적인 "자극성" CpG 서열과 "GC-풍부" 또는 "B-세포 중화" 모티프를 둘 다 가지고 있다. 이들 조합 모티프 핵산은 B 세포 활성화 및 수지상 세포 (DC) 활성화의 강력한 유도 인자인 전통적인 "클래스 B"에 연관되는 효과와 IFN- α 및 자연살해 (NK) 세포 활성화의 강력한 유도인자이면서도 B 세포 및 DC 활성화에 대해서는 비교적 열등한 유도 인자인 더 최근에 규명된 부류의 면역자극성 핵산 ("클래스 A" CpG ODN)에 연관되는 효과 사이의 어디쯤에 해당하는 면역자극 효과를 지닌다 [Krieg AM et al. (1995) Nature 374:546-9 ; Ballas ZK et al. (1996) J Immunol 157: 1840-5; Yamamoto S et al. (1992) J Immunol 148: 4072-6]. 바람직한 클래스 B CpG ODN은 흔히 포스포로티오에이트 골격을 가지고 바람직한 클래스 A CpG ODN은 혼합 또는 키메라 골격을 갖지만, 상기 새로운 부류의 조합 모티프 면역자극성 핵산은 안정화된, 예컨대 포스포로티오에이트, 키메라, 또는 포스포디에스테르 골격 중 하나를 가질 수도 있다.

[0072] 한 가지 측면에서, 본 발명은 상기한 새로운 부류의 조합 모티프 면역자극성 핵산에 속하는 면역자극성 핵산을 제공한다. B 세포 자극성 도메인은 다음 식으로 정의된다: 5' X₁DCGHX₂ 3'. D는 C 이외의 뉴클레오티드이다. C는 시토신이다. G는 구아닌이다. H는 G 이외의 뉴클레오티드이다.

[0073] X₁ 및 X₂는 0 내지 10개 뉴클레오티드 길이의 임의의 핵산 서열이다. X₁은 CG를 포함할 수 있으며, 이 경우 이 CG의 바로 앞에 T가 있는 것이 바람직하다. 일부 실시태양에서는 DCG가 TCG이다. X₁은 바람직하게는 길이가 0 내지 6개 뉴클레오티드이다. 일부 실시태양에서는, X₂가 폴리 G 또는 폴리 A 모티프를 전혀 포함하지 않는다. 다른 일부 실시태양에서는, 상기 면역자극성 핵산이 5' 말단 또는 3' 말단에 폴리-T 서열을 가진다. 본 명세서에서 사용될 때, "폴리-A" 또는 "폴리-T"는 각각 4개 이상의 연속되는 A 또는 T의 연장부, 예컨대 5'AAAA 3' 또는 5' TTTT 3'를 말한다.

[0074] 본 명세서에서, "폴리-G 말단"은 핵산의 5' 말단 또는 3' 말단에 존재하는 4개 이상의 연속되는 G의 연장부, 예컨대 5'GGGG 3'을 말한다. 본 명세서에서, "폴리-G 핵산"은 다음 식을 갖는 핵산을 말한다: 5' X₁X₂GGGX₃X₄ 3' (식 중, X₁, X₂, X₃, 및 X₄는 뉴클레오티드이며, 바람직하게는 X₃와 X₄ 중 적어도 하나는 G이다).

[0075] 상기 식으로 표현되는 B 세포 자극성 도메인에 대한 몇 가지 바람직한 디자인은 TTTTTCG, TCG, TTCG, TTTCG, TTTCG, TCGT, TTCGT, TTTCGT, TCGTCGT를 포함하는 것이다.

[0076] 상기 핵산의 두 번째 모티프는 P 또는 N으로 지칭되며, X₁의 바로 5'측 또는 X₂의 바로 3'측에 위치한다.

[0077] N은 CGG 트리뉴클레오티드로 시작되는 B-세포 중화 서열이며 길이가 10개 뉴클레오티드 이상이다. B-세포 중화 모티프는 CG의 앞에 C가 오거나 뒤에 G가 오는 하나 이상의 CpG 서열을 포함하거나 (Krieg AM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95 : 12631-12636), CG의 C가 메틸화되어 있는 CG 함유 DNA 서열이다. 본 명세서에서, "CpG"는 5' 시토신 (C)의 뒤에 3' 구아닌 (G)이 오면서 포스페이트 결합에 의해 연결되는 것을 말한다. 이러한 5' CG 3'에서 적어도 C는 메틸화되지 않아야 한다. 중화 모티프는, 다른 면에서는 비자극성인 모티프 중에 존재하는 경우에는 어느 정도의 면역자극능을 갖지만 다른 면역자극성 모티프의 맥락에 존재하는 경우에는 그 다른 모티프의 면역자극 포텐셜을 저하시키는 역할을 하는 모티프이다.

[0078] P는 길이가 10개 뉴클레오티드 이상인, GC-풍부 팔린드롬을 포함하고 있는 서열이다. 본 명세서에서, "팔린드

롬" 및 그와 동격으로 "팔린드롬 서열"은 역순 반복, 즉, ABCDEE'D'C'B'A' (여기서, A와 A', B와 B', 등은 통상의 왓슨-크릭 염기쌍을 형성할 수 있는 염기들임)와 같은 서열을 말한다.

- [0079] 본 명세서에서, "GC-풍부 팔린드롬"은 2/3 이상이 G' 및 C'로 된 염기 조성을 갖는 팔린드롬을 말한다. 일부 실시태양에서는 이 GC-풍부 도메인은 바람직하게는 "B 세포 자극성 도메인"의 3'측에 위치한다. 따라서, 10개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우, 8개 이상의 G' 및 C'를 포함한다. 12개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우에는, 역시 8개 이상의 G' 및 C'를 포함한다. 14-mer GC-풍부 팔린드롬의 경우에는, 팔린드롬 중 10개 이상의 염기가 G' 및 C'이다. 일부 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬이 완전히 G'와 C'로 만들어진다.
- [0080] 일부 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 81 % 이상이 G' 및 C'인 염기 조성을 보인다. 그러한 10개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우, 팔린드롬은 따라서 완전히 G'와 C'로 만들어진다. 그러한 12개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬의 경우, 팔린드롬 중 10개 (83%) 이상의 염기가 G' 및 C'인 것이 바람직하다. 일부 바람직한 실시태양에서는 12개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬이 완전히 G'와 C'로 만들어진다. 14-mer GC-풍부 팔린드롬의 경우, 팔린드롬 중 12개 (86 %) 이상의 염기가 G' 및 C'이다. 일부 바람직한 실시태양에서는, 14개 염기 길이의 GC-풍부 팔린드롬이 완전히 G'와 C'로 만들어진다. GC-풍부 팔린드롬의 C'는 메틸화되지 않은 상태일 수도 있고, 메틸화될 수도 있다.
- [0081] 일반적으로, 이 도메인은 C 및 G를 3개 이상, 더 바람직하게는 각각을 4개, 그리고 가장 바람직하게는 각각을 5개 이상 가진다. 이 도메인에 있는 C 및 G의 수는 동일할 필요가 없다. C 및 G가 CCGCGCGG와 같이, 자체-상보적인 이중나선, 또는 팔린드롬을 형성할 수 있도록 배열되는 것이 바람직하다. 여기에 A 또는 T가 개재될 수도 있으나, 예를 들어 모티프 CGACGTCGTCG (서열 80) 또는 CGGCGCCGTGCCG (서열 81)에서와 같이 자체-상보성이 적어도 부분적으로 보존되는 것이 바람직하다. 상보성이 보존되지 않는 경우에는 비상보적인 염기쌍이 TG인 것이 바람직하다. 바람직한 실시태양에서는, 팔린드롬의 일부가 아닌 염기쌍은 3개 이하, 바람직하게는 2개 이하, 그리고 가장 바람직하게는 단 1개의 연속되는 염기들이 있을 뿐이다. 일부 실시태양에서는 GC-풍부 팔린드롬은 하나 이상의 CGG 트리머, 하나 이상의 CCG 트리머, 또는 하나 이상의 CGCG 테트라머를 포함한다. 다른 일부 실시태양에서, GC-풍부 팔린드롬은 CCCCCGGGGG (서열 31) orGGGGGCCCCCC (서열 32), CCCCCGGGG (서열 33) 또는 GGGGGCCCC (서열 34)가 아니다.
- [0082] GC 풍부 영역의 G들 중 하나 이상이 이노신 (I)으로 치환될 수 있다. 일부 실시태양에서는 P가 둘 이상의 I를 포함한다.
- [0083] 특정 실시태양에서는, 상기 면역자극성 핵산은 다음 식 중 하나로 표시된다: 5' NX₁DCGHX₂ 3', 5' X₁DCGHX₂N 3', 5' PX₁DCGHX₂ 3', 5' X₁DCGHX₂P 3', 5' X₁DCGHX₂PX₃ 3', 5' X₁DCGHPX₃ 3', 5' DCGHX₂PX₃ 3', 5' TCGHX₂PX₃ 3', 5' DCGHPX₃ 3', 또는 5' DCGHP 3'.
- [0084] 다른 측면으로 본 발명은 다음의 식으로 정의되는 면역자극성 핵산을 제공한다: 5' N₁PyGN₂P 3'. N₁은 1 내지 6개 뉴클레오티드 길이의 임의의 서열이다. Py는 피리미딘이다. G는 구아닌이다. N₂는 0 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 임의의 서열이다. P는 길이가 10개 뉴클레오티드 이상인 GC-풍부 팔린드롬 포함 서열이다.
- [0085] N₁ 및 N₂는 50% 넘게 피리미딘을 함유할 수 있으며, 더 바람직하게는 50% 넘게 T를 함유할 수 있다. N₁은 CG를 포함할 수 있으며, 이 때 바람직하게는 T가 이 CG의 바로 앞에 온다. 일부 실시태양에서는 N₁PyG가 TCG (예컨대 5' TCGG가 있는 ODN 5376)이고, 가장 바람직하게는 TCGN₂ (여기서, N₂는 G가 아님)이다.
- [0086] N₁PyGN₂P는 하나 이상의 이노신 (I) 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. N₁ 중에 있는 C 또는 G는 이노신에 의해 치환될 수 있으나, CpI가 IpG보다 바람직하다. IpG와 같은 이노신 치환의 경우, 최적의 활성은 IG 또는 CI 사이의 연결기가 포스포디에스테르인 "반유연(semi-soft)" 또는 키메라 골격의 사용시에 얻어질 수 있다. N₁은 하나 이상의 CI, TCI, IG 또는 TIG 모티프를 포함할 수 있다.
- [0087] 특정 실시태양에서는, N₁PyGN₂는 TTTTCG, TCG, TTCG, TTTCG, TTTTCG, TCGT, TTCGT, TTTCGT 및 TCGTCGT로 이루어진 군으로부터 선택된 서열이다.
- [0088] 다른 측면에서 본 발명은 다음의 식으로 정의되는 면역자극성 핵산을 제공한다: 5' N₁PyG/IN₂P 3'. N₁은 1 내지 6개 뉴클레오티드 길이의 임의의 서열이다. Py는 피리미딘이고, G/I는 G 또는 I인 단일 뉴클레오티드를

말한다. G는 구아닌이고, I는 이노신이다. N₂는 0 내지 30개 뉴클레오티드 길이의 임의의 서열이다. P는 길이가 10개 뉴클레오티드 이상인 GC 또는 IC 풍부 팔린드롬 포함 서열이다. 일부 실시태양에서는 N₁PyIN₂는 TCITCITTTT (서열 47)이다.

[0089] 상술한 식으로 표시되는 조합 모티프 번역자극성 핵산의 몇 가지 비제한적 예에는 다음의 것들이 포함된다: TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 2395), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 2429), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 2430), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 2431), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 2432), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCGTTTTT (ODN 2452), TCCTGACGTTCGGCGCGCCG (ODN 5315), TZGTZGTTTTZGGZGZGZGZG (ODN 5327, 여기서, Z는 5-메틸시토신임), TCCTGACGTTCGGCGCGCCG (ODN 2136), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 5513), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 5514), TCGTCGTTTTTCGACGGCCG (ODN 5515), TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCGTCG (ODN 5516), TCGCGCGCGCCGTCGTCGTTT (ODN 2451), TCGTCGTTTTTCGACGGCCGTCG (ODN 20173), TCGTCGTTTTTCGACGATCGTCG (ODN 20176), TCGTCGTTTTTCGACGTACGTCG (ODN 20177), TCGTCGCGACGGCCGTCG (ODN 20178), TCGTCGCGACGATCGTCG (ODN 20179), TCGTCGCGACGTACGTCG (ODN 20180), TCGTTTTTTTCGACGGCCGTCG (ODN 20184), TCGTTTTTTTCGACGATCGTCG (ODN 20185), TCGTTTTTTTCGACGTACGTCG (ODN 20186), TIGTIGTTTTTCGGCGCGCCG (ODN 5569, 서열 63) 및 TCITCITTTTCGGCGCGCCG (ODN 5570, 서열 70).

[0090] 본 명세서에서, "핵산"과 "올리고뉴클레오티드"는 상호교환가능하게 사용되며 여러 개의 뉴클레오티드 (즉, 포스페이트기 및 치환된 피리미딘 (예, 시토신 (C), 티민 (T) 또는 우라실 (U)) 또는 치환된 푸린 (예, 아데닌 (A) 또는 구아닌 (G))인 교환가능한 유기 염기에 연결된 당 (예, 리보스 또는 데옥시리보스)을 포함하는 분자)를 말한다. 본 명세서에서, 이들 용어는 올리고데옥시리보뉴클레오티드 (ODN)뿐 아니라 올리고리보뉴클레오티드도 가리킨다. 이들 용어는 또한 폴리뉴클레오시드 (즉, 폴리뉴클레오티드에서 포스페이트가 빠진 것) 및 임의의 다른 유기 염기 함유 중합체를 포함한다. 핵산 분자는 기존의 핵산 공급원에서 얻을 수도 있으나 (예, 게놈 또는 cDNA), 바람직하게는 합성된 것이다 (예, 핵산 합성으로 제조됨).

[0091] 핵산 및 올리고뉴클레오티드라는 용어는 또한 염기 및(또는) 당 부분 등에 치환 또는 수식이 있는 핵산 또는 올리고뉴클레오티드까지 포괄한다. 예를 들어, 여기에는 3' 위치에 있는 히드록실기 및 5' 위치에 있는 포스페이트기 이외의 저분자량 유기기에 공유결합으로 부착된 골격 당을 갖는 핵산이 포함된다. 그렇게 수식된 핵산에는 2'-O-알킬화 리보스기가 포함될 수 있다. 또한, 수식된 핵산은 리보스 대신 아라비노스와 같은 당을 포함할 수도 있다. 따라서, 핵산은 골격 조성이 이질적이어서 펩티드-핵산 (핵산 염기가 달린 아미노산 골격을 갖는 것)과 같이 서로 연결된 임의의 가능한 중합체 단위 조합을 함유할 수 있다. 일부 실시태양에서는, 핵산의 골격 조성이 균질하다. 핵산은 또한 C-5 프로핀 수식 염기와 같은 치환된 푸린 및 피리미딘을 포함한다 [Wagner RW et al. (1996) Nat Biotechnol 14 : 840-4]. 푸린 및 피리미딘은 아데닌, 시토신, 구아닌, 티미딘, 5-메틸시토신, 2-아미노푸린, 2-아미노-6-클로로푸린, 2,6-디아미노푸린, 하이포크산틴, 및 기타 천연 및 비천연 핵염기, 치환 및 비치환 방향족 잔기를 포함하지만 여기에 한정되는 것은 아니다. 그러한 수식으로 다른 것들도 당업자들에게 알려져 있다.

[0092] 본 발명의 번역자극성 올리고뉴클레오티드는 천연 RNA 및 DNA에 대비하여, 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결부, β-D-리보스 단위 및(또는) 천연 뉴클레오시드 염기 (아데닌, 구아닌, 시토신, 티민, 우라실)가 관련된 다양한 화학적 수식 및 치환을 포괄할 수 있다. 화학적 수식의 예는 당업자들에게 알려져 있으며, 예컨대 문헌 [Uhlmann E et al. (1990) Chem Rev 90:543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993; Crooke ST et al.(1996) Annu Rev Pharmacol Toxicol 36:107-129; 및 Hunziker J et al. (1995) Mod Synth Methods 7: 331-417]에 기재되어 있다. 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 수식을 가질 수 있으며, 각 수식은 천연 DNA 또는 RNA로 이루어진 동일한 서열의 올리고뉴클레오티드에 대비하여 특정한 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결부 및(또는) 특정한 β-D-리보스 단위 및(또는) 특정한 천연 뉴클레오시드 염기 위치에 자리한다.

[0093] 예를 들면, 본 발명은 하나 이상의 수식을 포함하면서 각 수식이

[0094] a) 당 포스페이트 골격에서 당 포스페이트 단위의 다른 단위에 의한 치환,

[0095] b) 수식된 당 단위에 의한 β-D-리보스 단위의 치환, 및

[0096] c) 수식된 뉴클레오시드 염기에 의한 천연 뉴클레오시드 염기의 치환

- [0097] 으로부터 독립적으로 선택되는 올리고뉴클레오티드에 관련된 것이다.
- [0098] 올리고뉴클레오티드의 화학적 수식에 대한 더 자세한 예는 다음과 같다.
- [0099] 당 포스페이트 골격 (즉, 당 포스페이트 골격은 당 포스페이트 단위들로 구성됨)에서 당 포스페이트 단위 (즉, 함께 당 포스페이트 단위를 형성하는 β-D-리보스와 포스포디에스테르 뉴클레오시드간 연결부)는 "모르폴리노-유도체" 올리고머 (예컨대 문헌 [Stirchak EP et al. (1989) Nucleic Acids Res 17: 6129-41]에 기재된 것)를 형성하는 데 적절한 다른 단위에 의해 치환, 즉, 모르폴리노-유도체 단위 등에 의해 치환되거나; 또는 폴리아미드 핵산 ("PNA"; 예컨대 문헌 [Nielsen PE et al. (1994) Bioconjug Chem 5: 3-7]에 기재된 것)을 형성하기에 적합한 다른 단위에 의해 치환, 즉 PNA 골격 단위, 예컨대 2-아미노에틸글리신 등에 의해 치환될 수 있다.
- [0100] β-리보스 단위 또는 β-D-2'-데옥시리보스 단위는 수식된 당 단위에 의해 치환될 수 있는데, 상기 수식된 당 단위는 예를 들면 β-D-리보스, α-D-2'-데옥시리보스, L-2'-데옥시리보스, 2'-F-2'-데옥시리보스, 2'-O-(C₁-C₆)알킬-리보스 (바람직하게는 2'-O-(C₁-C₆)알킬-리보스는 2'-O-메틸리보스임), 2'-O-(C₂-C₆)알케닐-리보스, 2'-[O-(C₁-C₆)알킬-O-(C₁-C₆)알킬]-리보스, 2'-NH₂-2'-데옥시리보스, β-D-크실로-푸라노스, α-아라비노푸라노스, 2,4-디데옥시-β-D-에리트르-헥소-피라노스, 및 카르보시클릭 (예컨대 문헌 [Froehler J (1992) Am Chem Soc 114: 8320]에 기재된 것) 및(또는) 개방 사슬 당 유사체 (예컨대 문헌 [Vandendriessche et al. (1993) Tetrahedron 49: 7223]에 기재된 것) 및(또는) 비시클로당 유사체 (예컨대 문헌 [Tarkov M et al. (1993) Helv Chim Acta 76:481]에 기재된 것)로부터 선택된다.
- [0101] 천연 뉴클레오시드 염기는 수식된 뉴클레오시드 염기로 치환될 수 있으며, 상기 수식된 뉴클레오시드 염기는 예를 들면 하이포크산틴, 우라실, 디히드로우라실, 슈도우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-아미노우라실, 5-(C₁-C₆)-알킬우라실, 5-(C₂-C₆)-알케닐우라실, 5-(C₂-C₆)-알킬닐우라실, 5-(히드록시메틸)우라실, 5-클로로우라실, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-히드록시시토신, 5-(C₁-C₆)-알킬시토신, 5-(C₂-C₆)-알케닐시토신, 5-(C₂-C₆)-알킬닐시토신, 5-클로로시토신, 5-플루오로시토신, 5-브로모시토신, N²-디메틸구아노신, 2,4-디아미노-푸린, 8-아자푸린, 치환된 7-데아자푸린, 바람직하게는 7-데아자-7-치환 및(또는) 7-데아자-8-치환 푸린 또는 천연 뉴클레오시드 염기의 또다른 수식으로부터 선택된다. 위에 열거한 것은 예를 든 것이며 한정적인 것으로 해석해서는 안 된다.
- [0102] 본 명세서에서, "면역자극성 핵산"은 면역체계 세포의 기능적 특성을 유도하는 능력을 특징으로 하는 리보핵산 또는 데옥시리보핵산 분자, 그의 유도체 또는 유사체를 말한다. 그러한 면역계 세포의 기능적 특성에는 예를 들어 사이토카인 또는 케모카인의 합성, 세포 표면 표지의 발현, 항체의 분비, 세포 증식, 또는 항원 또는 항원 보유 막결합 표적에 대응하거나 대항하는 다른 활성이 포함될 수 있다.
- [0103] 본 발명에서 사용하기 위해, 본 발명의 핵산은 당업계에 알려져 있는 다수의 절차, 예컨대 β-시아노에틸 포스포라미다이트법 (Beaucage SL and Caruthers MH (1981) Tetrahedron Lett 22: 1859); 및 뉴클레오시드 H-포스포네이트법 (Garegg et al. (1986) Tetrahedron Lett 27: 4051-4; Froehler et al. (1986) Nucl Acid Res 14:5399-407; Garegg et al. (1986) Tetrahedron Lett 27: 4055-8; Gaffney et al. (1988) Tetrahedron Lett 29: 2619-22) 중 어느 하나를 이용하여 신규 합성할 수 있다. 이들 화학반응은 시판되는 다양한 자동화된 핵산 합성장치로 수행할 수 있다. 이들 핵산을 합성 핵산이라 칭한다. 이와 다르게는, 본 발명의 핵산은 플라스미드에 넣어 대규모로 생산하고 (문헌[Sambrook T et al., "Molecular Cloning : A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989] 참조) 더 작은 조각으로 분리하거나 전체로 투여할 수 있다. 핵산은 공지된 기술, 예컨대 제한 효소, 엑소뉴클레아제 또는 엔도뉴클레아제를 사용하는 기술을 사용하여 기존의 핵산 서열 (예, 게놈 또는 cDNA)로부터 제조할 수도 있다. 이런 방식으로 제조된 핵산을 단리된 핵산이라 칭한다. 단리된 핵산은 일반적으로, 자연 상태에서라면 보통 결합되어 있을 성분들로부터 분리되어 있는 핵산을 말한다. 한 예로서, 단리된 핵산은 세포, 핵, 미토콘드리아 또는 염색질로부터 분리되어 있는 핵산일 수 있다. 본 발명의 조합 모티프 핵산은 합성 및 단리된 조합 모티프 핵산 양쪽을 포괄한다.
- [0104] 생체 내에서 사용하기 위해, 조합 모티프 면역자극성 핵산은 경우에 따라 분해에 대해 비교적 저항성일 (예, 안정화될) 수 있다. "안정화된 핵산 분자"는 생체 내 분해 (예, 엑소뉴클레아제 또는 엔도뉴클레아제에 의한 것)에 대해 비교적 저항성인 핵산 분자를 뜻한다. 핵산 안정화는 포스페이트 골격 수식을 통해 이루어질 수 있다. 바람직한 본 발명의 안정화된 핵산은 수식된 골격을 가진다. 핵산 골격의 수식이 생체 내 투여시 조합 모티프 면역자극성 핵산의 증진된 활성을 제공한다는 것이 밝혀졌다. 포스포로티오에이트 연결기를 갖는 조합 모

티프 면역자극성 핵산은 몇몇 경우에 최대의 활성을 제공하며 핵산이 세포내 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제에 의해 분해되지 않도록 보호해준다. 다른 수식된 핵산에는 수식된 포스포디에스테르 핵산, 포스포디에스테르와 포스포로티오에이트 핵산의 조합 (즉, 키메라), 메틸포스포네이트, 메틸포스포로티오에이트, 포스포로티오에이트, p-에톡시 및 이들의 조합이 포함된다.

[0105] 포스포로티오에이트와 같은 수식된 골격은 포스포라미데이트 또는 H-포스포네이트 화학반응을 이용하는 자동화된 기법을 이용하여 합성할 수 있다. 아릴- 및 알킬-포스포네이트는 예컨대 미국 특허 제4,469,863호에 기재된 것과 같이 제조할 수 있고; 알킬포스포트리에스테르 (전하를 띤 산소 잔기가 미국 특허 제5,023,243호 및 유럽특허 제092,574호에 기재된 대로 알킬화된 것)는 시판되는 시약을 사용하여 자동화된 고체상 합성에 의해 제조할 수 있다. 다른 DNA 골격 수식 및 치환을 행하는 방법들도 문헌에 기재되어 있다 [Uhlmann E and Peyman A (1990) Chem Rev 90:544; Goodchild J (1990) Bioconjugate Chem 1: 165].

[0106] 기타 안정화된 핵산에는 비이온성 DNA 유사체, 예컨대 알킬- 및 아릴포스페이트 (전하를 띤 포스포네이트 산소가 알킬 또는 아릴기로 치환된 것), 포스포디에스테르 및 알킬포스포트리에스테르 (전하를 띤 산소 잔기가 알킬화된 것)가 포함된다. 테트라에틸렌글리콜 또는 핵사에틸렌글리콜과 같은 디올을 한측 또는 양측 말단에 함유한 핵산 역시 뉴클레아제 분해에 대해 실질적으로 저항성인 것으로 밝혀졌다.

[0107] 다른 일부 실시태양에서는, 본 발명의 면역자극성 핵산은 포스포디에스테르 또는 키메라, 예컨대 유연 또는 반유연 골격을 가질 수 있다. 키메라 골격은 포스포디에스테르와 수식된 골격 연결기의 조합을 포함한다. 예를 들어 키메라 올리고뉴클레오티드는 유연 올리고뉴클레오티드 또는 반유연 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0108] 유연 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기가 하나 이상의 내부 피리미딘 뉴클레오시드-구아노신 (YG) 디뉴클레오티드 내에, 그리고 그에 직접 인접하여서만 존재하는 부분적으로 안정화된 골격을 갖는 면역자극성 올리고뉴클레오티드이다. 상기 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드 자체는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기를 가진다. 상기 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드에 직접 인접하여 존재하는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기는 상기 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드에 대해 5', 3', 또는 5'과 3' 양측일 수 있다. 바람직하게는 상기 하나 이상의 내부 YG 디뉴클레오티드에 직접 인접하여 존재하는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기는 그 자체가 내부 뉴클레오시드간 연결기이다. 그에 따라 서열 N_1YGN_2 (식 중, N_1 과 N_2 는 각각 서로 독립적으로 임의의 단일 뉴클레오티드임)의 경우, YG 디뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기를 가지며, 또한 (a) N_1 이 내부 뉴클레오티드일 때 N_1 과 Y는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기에 의해 연결되거나, (b) N_2 가 내부 뉴클레오티드일 때 G와 N_2 는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기에 의해 연결되거나, (c) N_1 이 내부 뉴클레오티드일 때 N_1 과 Y는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기에 의해 연결되고, N_2 가 내부 뉴클레오티드일 때 G와 N_2 는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기에 의해 연결된다.

[0109] 반유연 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 또는 포스포디에스테르 유사 뉴클레오시드간 연결기가 하나 이상의 내부 피리미딘 뉴클레오시드-구아노신 (YG) 디뉴클레오티드 내에만 존재하는 부분적으로 안정화된 골격을 갖는 면역자극성 올리고뉴클레오티드이다. 반유연 올리고뉴클레오티드는 완전히 안정화된 골격을 갖는 면역자극성 올리고뉴클레오티드에 비해 다수의 이점을 가질 수 있다. 예를 들면, 반유연 올리고뉴클레오티드는 상응하는 완전 안정화된 면역자극성 올리고뉴클레오티드에 비해 증가된 면역자극 효력을 가질 수 있다.

[0110] 본 발명의 면역자극성 핵산은 대상을 치료하여 면역 반응을 유도하거나 면역 관련 질환, 예컨대 감염 질환, 암 및 알레르기성 질환 등을 치료하는 데 사용할 수 있다. 본 명세서에서, "대상"은 인간 또는 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 양, 염소, 닭, 원숭이, 토끼, 래트, 마우스 등을 포함하나 그에 한정되지 않는 척추 동물을 말한다.

[0111] 본 명세서에서, "치료", "치료하는" 및 "치료되는"이란 용어는 대상이 질환을 발병한 후 질환과 싸우기 위한, 예컨대 질환을 줄이거나 완전히 제거하거나 질환이 악화되는 것을 막기 위한 치료뿐 아니라 질환의 발병에 대한 대상의 저항성을 증강시키는, 달리 말해 대상이 질환을 발병할 가능성을 감소시키거나 질환의 발병을 지연시키는 예방적 치료도 가리킨다. 예를 들면, 감염 질환의 치료와 관련하여 사용될 때 상기 용어들은 대상이 감염된 후 감염 질환과 싸우기 위한, 예컨대 감염 질환을 줄이거나 완전히 제거하거나 감염 질환이 악화되는 것을 방지

하기 위한 치료뿐 아니라 미생물에 대한 대상의 저항성을 증가시키는, 또는 달리 말해 대상이 미생물에 의한 감염 질환을 발병할 가능성을 감소시키는 예방적 치료 역시 가리킨다. 암과 같은 질병과 관련하여 사용될 때 상기 용어들은 암의 발병을 방지 또는 지연시키는 것, 암의 증상을 감소시키는 것, 및(또는) 확인된 암의 성장을 억제하거나 느리게 하는 것을 말한다.

[0112] 따라서, 본 발명의 핵산은 감염성 유기체에 의한 감염증의 발병 위험이 있는 대상 또는 알레르기성 질환 또는 암의 발병 위험이 있는 대상의 면역을 유도하기 위한 예방치료제로 유용하다. 본 명세서에서, "위험이 있는 대상"은 감염증을 유발하는 감염성 병원체에 노출되거나, 알레르겐에 노출되거나, 암이 발병할 위험이 조금이라도 있는 대상이다. 예를 들면, 위험이 있는 대상은 특정한 유형의 감염원 또는 알레르겐이 발견된 지역으로 여행할 계획이 있는 대상일 수도 있고, 생활양식 또는 의료 절차를 통해 감염성 유기체를 함유할 수 있는 체액에 노출되는 대상일 수도 있으며, 심지어 감염성 유기체나 알레르겐이 확인된 지역에 살면서 상기 감염성 유기체나 알레르겐에 직접 노출된 임의의 대상일 수도 있다. 위험이 있는 대상은 군 관계자 또는 테러리스트 공격의 위험이 있는 지역에 사는 사람과 같이 생물무기의 위험에 노출된 대상일 수도 있다. 감염증 발병 위험이 있는 대상에는 또한 의료 기관으로부터 특정한 감염성 유기체 항원의 백신 접종을 권유받은 전체 인구집단도 포함된다. 항원이 알레르겐이고 대상이 그 특정한 항원에 대해 알레르기 반응을 일으키며 대상이 그 항원에 노출된다면, 즉 꽃가루받이철 동안에는 그 대상은 그 항원에 노출될 위험이 있다. 암이 발병할 위험이 있는 대상에는 유전적 소인이 있거나 이전에 암 때문에 치료받았던 대상과 담배, 석면, 및 기타 화학 독소 또는 과도한 태양광 및 다른 종류의 방사선과 같은 발암인자에 노출된 대상이 포함된다. 본 발명의 핵산은 감염 질환, 암 및 알레르기성 질환의 치료에 치료제로서도 유용하다.

[0113] "감염증에 걸린 대상"은 감염성 병원체에 노출되었고 검출가능한 수준의 급성 또는 만성 병원체가 체내에 존재하는 대상이다. 본 발명의 면역자극성 핵산은 단독으로, 또는 항원 또는 항미생물 의약과 같은 다른 치료제와 함께 사용하여 감염성 병원체를 감소시키거나 박멸시킬 수 있는 면역 반응을 갖추도록 할 수 있다. 이 방법에는 감염증에 걸렸거나 발병 위험이 있는 대상에게 유효량의 본 발명의 조합 모티프 면역자극성 핵산을 투여하여 감염증을 치료하도록 하는 것이 포함된다. 이 방법은 인간 또는 인간 이외의 척추동물 대상에서 바이러스, 세균, 진균 및 기생충 감염증을 치료하는 데 사용할 수 있다.

[0114] 본 명세서에서, "감염" 및 그와 동등하게 "감염 질환"은 대상의 체내에 외래 미생물의 존재에 기인하는 질환을 말한다. 외래 미생물은 바이러스, 세균, 진균 또는 기생충일 수 있다.

[0115] 감염성 바이러스의 예에는 다음의 것들이 포함된다: 레트로비리대 (*Retroviridae*) (예컨대, HIV-1 (HTLV-III, LAV, 또는 HTLV-III/LAV, 또는 HIV-III로도 불림)와 같은 인간 면역결핍증 바이러스; 및 HIV-LP와 같은 다른 단리체); 피코르나비리대 (*Picornaviridae*) (예, 소아마비 바이러스, 간염 A 바이러스; 장내바이러스, 인간 콕사키 바이러스, 리노바이러스 (*rhinoviruse*), 에코바이러스 (*echoviruse*)); 칼시비리대 (*Calciviridae*) (예, 위장염을 일으키는 균주); 토가비리대 (*Togaviridae*) (예, 뇌염 바이러스, 풍진 바이러스); 플라비리대 (*Flaviridae*) (예, 뎅그 바이러스, 뇌염 바이러스, 황열 바이러스); 코로나비리대 (*Coronaviridae*) (예, 코로나바이러스); 람도비리대 (*Rhabdoviridae*) (예, 수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스); 필로비리대 (*Filoviridae*) (예, 에볼라 바이러스); 파라믹소비리대 (*Paramyxoviridae*) (예, 파라인플루엔자 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 홍역 바이러스, RS 바이러스); 오르토믹소비리대 (*Orthomyxoviridae*) (예, 인플루엔자 바이러스); 병가비리대 (*Bungaviridae*) (예, 한탄 바이러스, 병가 바이러스, 플레보바이러스 (*phleboviruse*) 및 나이로 바이러스); 아레나 비리대 (*Arena viridae*) (출혈열 바이러스); 레오비리대 (*Reoviridae*) (예, 레오바이러스, 오르비바이러스 및 로타바이러스); 비르나비리대 (*Birnaviridae*); 헤파드나비리대 (*Hepadnaviridae*) (간염 B 바이러스); 파르보비리대 (*Parvoviridae*) (파르보바이러스); 파포바비리대 (*Papovaviridae*) (유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스); 아데노비리대 (*Adenoviridae*) (대부분의 아데노바이러스); 헤르페스비리대 (*Herpesviridae*) (헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) 1 및 2, 수두-대상포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스 (CMV), 헤르페스 바이러스); 포스비리대 (*Poxviridae*) (천연두 바이러스, 백시니아 바이러스, 포스 바이러스); 및 이리도비리대 (*Iridoviridae*) (예, 아프리카 돼지 열 바이러스); 및 미분류 바이러스 (예, 해면상 뇌병증의 병인체, 델타 간염의 병인체 (간염 B 바이러스의 결함있는 위성인 것으로 생각됨), 비-A, 비-B 간염의 병인체 (클래스 1 = 내부로 전염됨; 클래스 2 = 비경구로 전염됨 (즉, 간염 C); 노르윅크 (Norwalk) 및 관련 바이러스, 및 아스트로바이러스).

[0116] 감염성 세균의 예에는 다음의 것들이 포함된다: 악티노마이세스 이스라엘리 (*Actinomyces israeli*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*), 박테로이데스 종 (*Bacteroides sp.*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borelia burgdorferi*), 클라미디아 트라코마티스 (*Chlamydia trachomatis*), 클로스트리디움 퍼프링겐스 (*Clostridium*

perfringens), 클로스트리디움 테타니 (*Clostridium tetani*), 코리네박테리움 디프테리아 (*Corynebacterium diphtheriae*), 코리네박테리움 종 (*Corynebacterium sp.*), 엔테로박터 애로게네스 (*Enterobacter aerogenes*), 엔테로코쿠스 종 (*Enterococcus sp.*), 이리시켈로트릭스 루시오파씨아 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), 퓨조박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*), 헤모필루스 인플루엔자 (*Haemophilus influenzae*), 헬리코박터 파이로리스 (*Helicobacter pylori*), 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*), 레지오넬라 뉴모필리아 (*Legionella pneumophila*), 렙토스피라 (*Leptospira*), 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*), 마이코박테리아 종 (*Mycobacteria spp.*) (예, 마이코박테리아 튜버클로시스 (*M. tuberculosis*), 마이코박테리아 아비움 (*M. avium*), 마이코박테리아 인트라셀룰라 (*M. intracellulare*), 마이코박테리아 칸자시 (*M. kansasii*), 마이코박테리아 고르도나 (*M. gordonae*), 네이세리아 고노르호에아 (*Neisseria gonorrhoeae*), 네이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*), 파스투렐라 물토시다 (*Pasturella multocida*), 병원성 캄필로박터 종 (*Campylobacter sp.*), 스태필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 스트렙토바실러스 모닐리포르미스 (*Streptobacillus moniliformis*), 스트렙토코쿠스 (혐기성 종), 스트렙토코쿠스 (비리단스 군), 스트렙토코쿠스 아갈락티아 (*Streptococcus agalactiae*) (스트렙토코쿠스 B 군), 스트렙토코쿠스 보비스 (*Streptococcus bovis*), 스트렙토코쿠스 파칼리스 (*Streptococcus faecalis*), 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*), 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) (스트렙토코쿠스 A 군), 트레포네마 팔리디움 (*Treponema pallidum*) 및 트레포네마 페테뉴 (*Treponema pertense*).

[0117] 감염성 진균의 예에는 다음의 것들이 포함된다: 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 크립토코쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라스마 캡슐라툼 (*Histoplasma capsulatum*), 콕시디오이데스 이미티스 (*Coccidioides immitis*) 및 블라스토마이세스 데르마티티디스 (*Blastomyces dermatitidis*).

[0118] 다른 감염성 유기체 (즉, 원생생물)에는 플라스모디움 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 말라리아 (*Plasmodium malariae*), 플라스모디움 오발 (*Plasmodium ovale*) 및 플라스모디움 비박스 (*Plasmodium vivax*)와 같은 플라스모디움 (*Plasmodium*) 종 및 톡소플라스마 곤디 (*Toxoplasma gondii*)가 포함된다. 혈액성 및(또는) 조직 기생충에는 플라스모디움 종, 바베시아 마이크로티 (*Babesia microti*), 바베시아 디버겐스 (*Babesia divergens*), 레이쉬마니아 트로피카 (*Leishmania tropica*), 레이쉬마니아 종, 레이쉬마니아 브라질리엔시스 (*Leishmania braziliensis*), 레이쉬마니아 도노바니 (*Leishmania donovani*), 트리파노소마 감비엔스 (*Trypanosoma gambiense*) 및 트리파노소마 로데시엔스 (*Trypanosoma rhodesiense* (아프리카 수면병)), 트리파노소마 크루지 (*Trypanosoma cruzi*) (샤가스병(Chagas' disease)) 및 톡소플라스마 곤디가 포함된다.

[0119] 상기한 바이러스, 세균, 진균 및 기타 감염성 미생물의 목록은 대표적인 것이며 제한적이 아님을 이해해야 한다. 기타 의학적으로 관련있는 미생물은 문헌에 광범위하게 기재되어 있다 (예, 본 명세서 내용에 포함시키기로 하는 C.G.A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, Great Britain 1983 참조).

[0120] 상술한 다수의 미생물 제제가 인간 질환과 관련되어 있다 하더라도, 본 발명은 인간 이외의 척추동물을 치료하는 데에도 유용하다. 인간 이외의 척추동물 역시 본원에 개시된 면역자극성 핵산으로 예방되거나 치료될 수 있는 감염증에 걸릴 수 있다. 예를 들어, 감염성 인간 질환의 치료 이외에, 본 발명의 방법은 동물의 감염을 치료하는 데 유용하다.

[0121] 인간 및 인간 이외의 척추동물 둘다의 감염성 바이러스에는 레트로바이러스, RNA 바이러스 및 DNA 바이러스가 포함된다. 이러한 레트로바이러스 군에는 단순 레트로바이러스 및 복합 레트로바이러스 둘다가 포함된다. 단순 레트로바이러스에는 B-형 레트로바이러스, C-형 레트로바이러스 및 D-형 레트로바이러스의 하위군이 포함된다. B-형 레트로바이러스의 한 예는 마우스 유방종양 바이러스 (MMTV)이다. C-형 레트로바이러스에는 하위군 C-형 A 군 (라우스 육종 바이러스 (RSV), 조류 백혈병 바이러스 (ALV) 및 조류 골수아구증 바이러스 (AMV)를 포함함) 및 C-형 B 군 (고양이 백혈병 바이러스 (FeLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 (GALV), 비장 괴사 바이러스 (SNV), 망상내피조직증 바이러스 (reticuloendotheliosis virus, RV) 및 원숭이 육종 바이러스 (SSV)를 포함함)이 포함된다. D-형 레트로바이러스에는 메이슨-화이자 원숭이 바이러스 (MPMV) 및 원숭이 레트로바이러스 타입 1 (SRV-1)이 포함된다. 복합 레트로바이러스에는 렌티바이러스, T-세포 백혈병 바이러스 및 발포성 바이러스 (foamy virus)의 하위군이 포함된다. 렌티바이러스에는 HIV-1이 포함되나, HIV-2, SIV, 비스나 바이러스, 고양이 면역결핍증 바이러스 (FIV) 및 말 감염성 빈혈 바이러스 (EIAV)도 포함된다. T-세포 백혈병 바이러스에는 HTLV-1, HTLV-II, 원숭이 T-세포 백혈병 바이러스 (STLV) 및 소 백혈병 바이러스 (BLV)가 포함된다. 발포성 바이러스에는 인간 발포성 바이러스 (HFV), 원숭이 발포성 바이러스 (SFV) 및 소 발포성 바이러스 (BFV)가

포함된다.

[0122]

척추동물에서 감염원인 다른 RNA 바이러스의 예에는 오르토레오바이러스 (Orthoreovirus) 속 (포유동물 및 조류 레트로바이러스 둘다의 다수의 혈청형), 오르비바이러스 (Orbivirus) 속 (청설병 바이러스, 유계난기 바이러스 (Eugeningee virus), 케메로보 바이러스 (Kemerovo virus), 아프리카 말 병 바이러스 (African horse sickness virus) 및 콜로라도 진드기 열 바이러스), 및 로타바이러스 (Rotavirus) 속 (인간 로타바이러스, 네브라스카 소 설사 바이러스, 원숭이 로타바이러스, 소 및 양 로타바이러스, 조류 로타바이러스)를 포함하는 레오비리과 (Reoviridae) 바이러스; 엔테로바이러스 속 (소아마비 바이러스, 콕사키 바이러스 A 및 B, 소장 세포변성 인간 고아 (ECHO) 바이러스, 간염 A 바이러스, 원숭이 엔테로바이러스, 쥐 뇌척수염 (ME) 바이러스, 폴리오바이러스 뮤리스, 소 엔테로바이러스, 돼지 엔테로바이러스), 카디오바이러스 (Cardiovirus) 속 (뇌척수염 바이러스 (EMC), 멘고바이러스 (Mengovirus)), 리노바이러스 (Rhinovirus) 속 (113가지 이상의 서브타입을 포함하는 인간 리노바이러스; 기타 리노바이러스), 및 앵토바이러스 (Aphovirus) 속 (구제역 바이러스 (FMDV))을 포함하는 피코르나비리과 (Picornaviridae) 바이러스; 소포성 발진 돼지 바이러스, 산 미구엘 바다사자 바이러스 (San Miguel sea lion virus), 고양이 피코르나바이러스 (picornavirus) 및 노르워크 바이러스를 포함하는 칼시비리과 (Calciviridae) 바이러스; 알파바이러스 (Alphavirus) 속 (동부 말 뇌염 바이러스, 쉘키 숲 바이러스 (Semliki forest virus), 신드비스 바이러스 (Sindbis virus), 치쿱구나 바이러스 (Chikungunya virus), 오녕-녕 바이러스 (O'Nyong-Nyong virus), 로스 리버 바이러스 (Ross river virus), 베네수엘라 말 뇌염 바이러스, 서부 말 뇌염 바이러스), 플라비바이러스 (Flavivirus) 속 (모기로부터 유래된 황열 바이러스, 뎅그 바이러스 (Dengue virus), 일본 뇌염 바이러스, 세인트 루이스 뇌염 바이러스, 머레이 벨리 뇌염 바이러스, 웨스트 나일 바이러스 (West Nile virus), 군진 바이러스 (Kunjin virus), 중앙 유럽 진드기 유래 바이러스, 극동 진드기 유래 바이러스, 카사누르 숲 바이러스 (Kyasanur forest virus), 루핑 III 바이러스 (Louping III virus), 포와산 바이러스 (Powassan virus), 옴스크 출혈열 바이러스 (Omsk hemorrhagic fever virus)), 루비바이러스 (Rubivirus) 속 (풍진 바이러스), 및 페스티바이러스 (Pestivirus) 속 (점막 질환 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 국경 질환 바이러스)을 포함하는 토가비리과 (Togaviridae) 바이러스; 버니바이러스 (Bunyvirus) 속 (번양웨어 (Bunyamwera) 및 관련 바이러스, 캘리포니아 뇌염 군 바이러스), 플레보바이러스 (Phlebovirus) 속 (모래파리 열 시칠리안 바이러스, 리프트 밸리 열 바이러스 (Rift Valley fever virus)), 나이로바이러스 (Nairovirus) 속 (크림-콩고 출혈열 바이러스 (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus), 나이로비 양 질환 바이러스 (Nairobi sheep disease virus)), 및 유쿠바이러스 (Uukuvirus) 속 (유쿠니에미 (Uukuniemi) 및 관련 바이러스)를 포함하는 번야비리과 (Bunyviridae) 바이러스; 인플루엔자 바이러스 속 ((인플루엔자 바이러스 타입 A, 다수의 인간 서브타입), 돼지 인플루엔자 바이러스, 조류 및 말 인플루엔자 바이러스, 인플루엔자 타입 B (다수의 인간 서브타입), 인플루엔자 타입 C (별개의 속 가능성))을 포함하는 오르토믹소비리과 (Orthomyxoviridae) 바이러스; 파라믹소바이러스 (Paramyxovirus) 속 (파라인플루엔자 바이러스 타입 1, 센다이 바이러스, 혈구흡착 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 타입 2 내지 5, 뉴케슬병 바이러스, 볼거리 바이러스), 모르빌리바이러스 (Morbillivirus) 속 (홍역 바이러스, 아급 경화성 범뇌염 바이러스, 디스토펜 바이러스, 우역 바이러스), 뉴모바이러스 (Pneumovirus) 속 (호흡기 합포체 바이러스 (RSV), 소 호흡기 합포체 바이러스 및 페럼 바이러스)를 포함하는 파라믹소비리과 (paramyxoviridae) 바이러스; 베시쿨로바이러스 (Vesiculovirus; VSV) 속 (캔디푸라 바이러스 (Candipura virus), 플란더스-하트 파크 바이러스 (Flanders-Hart Park virus)), 리사바이러스 (Lyssavirus) 속 (광견병 바이러스), 어류 랍도바이러스 (fish Rhabdovirus), 및 2가지 잠정적인 랍도바이러스 (마르버그 바이러스 (Marburg virus) 및 에볼라 바이러스)를 포함하는 랍도비리과 (Rhabdoviridae) 바이러스; 림프구 맥락수막염 바이러스 (LCM), 타카리브 바이러스 킴플렉스 (Tacaribe virus complex) 및 라사 바이러스 (Lassa virus)를 포함하는 아레나비리과 (Arenaviridae) 바이러스; 감염성 기관지염 바이러스 (IBV), 간염 바이러스, 인간 소장 코로나 바이러스 및 고양이 감염성 복막염 바이러스 (고양이 코로나바이러스)를 포함하는 코로노아비리과 (Coronoviridae) 바이러스가 포함되나, 이에 한정되지는 않는다.

[0123]

척추동물에서 감염원인 예시적인 DNA 바이러스에는 오르토폭스바이러스 (Orthopoxvirus) 속 (Variola major, Variola minor, Monkey pox Vaccinia, Cowpox, Buffalopox, Rabbitpox, Ectromelia), 레포리포스바이러스 (Leporipoxvirus) 속 (Myxoma, Fibroma), 아비포스바이러스 (Avipoxvirus) 속 (Fowlpox, 기타 조류 포스바이러스), 카프리포스바이러스 (Capripoxvirus) 속 (sheeppox, goatpox), 수이포스바이러스 (Suipoxvirus) 속 (Swinepox), 파라포스바이러스 (Parapoxvirus) 속 (전염성 농포성 피부염 바이러스, 가성우두, 소 구진상 구내염 바이러스)을 포함하는 포스비리과 (Poxviridae) 바이러스; 이리도비리과 (Iridoviridae) 바이러스 (African swine fever virus, Frog viruses 2 및 3, 어류의 림프낭종 (Lymphocystis) 바이러스); 알파-헤르페

스 바이러스 (헤르페스 심플렉스 타입 1 및 2, 바리셀라-조스터, 말 유산 바이러스, 말 헤르페스 바이러스 2 및 3, 가성광견병 바이러스, 감염성 소 각결막염 바이러스, 감염성 소 비기관염 바이러스, 고양이 비기관염 바이러스, 감염성 후두기관염 바이러스), 베타-헤르페스바이러스 (인간 사이토메갈로바이러스 및 돼지 및 원숭이의 사이토메갈로바이러스), 감마-헤르페스바이러스 (엡스타인-바 바이러스, EBV), 마렉병 바이러스, 헤르페스 사이미리(Herpes saimiri), 헤르페스바이러스 아텔레스 (Herpesvirus ateles), 헤르페스바이러스 실비라구스 (Herpesvirus sylvilagus), 기니픽 헤르페스 바이러스, 루크(Lucke) 중앙 바이러스)를 포함하는 헤르페스비리과과 (Herpesviridae) 바이러스; 마스트아데노바이러스 (Mastadenovirus) 속 (인간 서브그룹 A, B, C, D, E 및 그룹에 속하지 않는 것들; 원숭이 아데노바이러스 (23개 이상의 혈청형), 감염성 개 간염, 및 소, 돼지, 양, 개구리 및 많은 다른 종의 아데노바이러스), 아비아데노바이러스 (Aviadenovirus) 속 (조류 아데노바이러스), 및 비-배양성 아데노바이러스를 포함하는 아데노비리과과 (Adenoviridae) 바이러스; 파필로마바이러스 속 (인간 유두종 바이러스, 소 유두종 바이러스, 쇼프 토끼 유두종 바이러스, 및 다른 종의 다양한 병원성 유두종 바이러스), 폴리오마바이러스 속 (Polyomavirus, 원숭이 공포형성 제제 (Simian vacuolating agent) (SV-40), 토끼 공포형성 제제 (Rabbit vacuolating agent) (RKV), K 바이러스, BK 바이러스, JC 바이러스, 및 다른 영장류 폴리오마 바이러스, 예를 들어 림프구친화성 유두종 바이러스)을 포함하는 파포비리과과 (Papoviridae) 바이러스; 아데노-관련 바이러스 속, 파르보바이러스 (Parvovirus) 속 (고양이 범백혈구감소 바이러스, 소 파르보바이러스, 개 파르보바이러스, 알루산 밍크 (Aleutian mink) 병 바이러스 등)을 포함하는 파르보비리과과 (Parvoviridae) 바이러스가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 마지막으로, DNA 바이러스에는 상기 과에 속하지 않는 것들, 예를 들어 쿠루 (Kuru) 및 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-Jacob)병 바이러스 및 만성 감염성 신경병 물질 (CHINA virus)이 포함될 수 있다.

[0124] 본 발명의 핵산은 항미생물제와 함께 대상에게 투여될 수 있다. 본 명세서에서, 항미생물제는 감염성 미생물을 죽이거나 억제할 수 있는 천연, 합성 또는 반합성 화합물을 말한다. 본 발명에 따른 유용한 항미생물제의 종류는 대상이 감염되었거나 감염될 위험이 있는 미생물의 종류에 따라 달라질 것이다. 항미생물제는 항균제, 항바이러스제, 항진균제 및 구충제를 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다. "항감염제", "항균제", "항바이러스제", "항진균제", "구충제" 및 "살충제"와 같은 용어는 당업자에게 잘 확립된 의미를 가지며, 보통의 의학적 맥락에서 정의된다. 요컨대, 항균제는 세균을 죽이거나 억제하며, 항생제뿐 아니라 비슷한 기능을 갖는 다른 합성 또는 천연 화합물을 포함한다. 항생제는 미생물과 같은 세포에 의해 부수적인 대사물질로 생산되는 저분자량 분자들이다. 일반적으로, 항생제는 해당 미생물에 특이적이면서 숙주 세포에는 존재하지 않는 한 가지 이상의 세균 기능 또는 구조를 방해한다. 항바이러스제는 천연 원료에서 단리하거나 합성할 수 있으며, 바이러스를 죽이거나 억제하는 데 유용하다. 항진균제는 표면적인 진균 감염뿐 아니라 기회성 및 원발성 전신 진균 감염을 치료하는 데 사용한다. 구충제는 기생충을 죽이거나 억제한다.

[0125] 항균제는 세균의 성장이나 기능을 없애거나 억제한다. 많은 부류의 항균제가 항생제이다. 광범위한 세균을 죽이거나 억제하는 데 효과적인 항생제는 넓은 스펙트럼을 갖는 항생제라고 한다. 다른 유형의 항생제는 그람 양성 또는 그람 음성균의 박테리아에 대하여 주로 효과적이다. 이러한 유형의 항생제는 좁은 스펙트럼을 갖는 항생제라고 한다. 단일 생물 또는 질환에 대해서는 효과적이지만 다른 유형의 박테리아에 대해서는 그렇지 못한 다른 항생제는 제한된 스펙트럼을 갖는 항생제라고 한다. 항균제는 종종 주된 작용 방식을 기초로 분류된다. 일반적으로, 항균제는 세포벽 합성 억제제, 세포막 억제제, 단백질 합성 억제제, 핵산 합성 또는 기능 억제제, 및 경쟁적 억제제이다.

[0126] 항바이러스제는 바이러스에 의한 세포 감염 또는 세포내에서 바이러스의 복제를 방지하는 화합물이다. 바이러스의 복제 과정은 숙주 세포내의 DNA 복제와 너무 밀접한 관련이 있어 비특이적 항바이러스제는 종종 숙주에 대해 독성을 나타내기 때문에 항바이러스성 약물은 항균성 약물보다는 수가 훨씬 적다. 바이러스의 감염 과정에는 항바이러스제에 의해 차단 또는 억제될 수 있는 몇 가지 단계가 있다. 이러한 단계들에는 숙주 세포에 대한 바이러스의 부착 단계 (면역글로불린 또는 결합 펩티드), 바이러스의 코팅제거 단계 (예, 아만타딘), 바이러스 mRNA의 합성 또는 번역 단계 (예, 인터페론), 바이러스 RNA 또는 DNA의 복제 단계 (예, 뉴클레오시드 유사체), 새로운 바이러스 단백질의 성숙 단계 (예, 프로테아제 억제제), 및 새로운 바이러스의 돌출 및 방출 단계가 포함된다.

[0127] 뉴클레오티드 유사체는 뉴클레오티드와 유사하지만, 불완전하거나 비정상적인 테옥시리보스 또는 리보스기를 보유하는 합성 화합물이다. 뉴클레오티드 유사체가 세포내에 들어가면, 이들은 인산화되어, 바이러스 DNA 또는 RNA로의 편입을 두고 정상적인 뉴클레오티드와 경쟁하는 트리포스페이트 형태를 생산한다. 뉴클레오티드 유사체의 트리포스페이트 형태가 연장 중인 핵산 사슬 내로 편입되는 경우, 이 유사체는 바이러스 폴리머라제와 비

가역적으로 결합하여 사슬 연장을 종결시킨다. 뉴클레오티드 유사체에는 아시클로비르 (acyclovir) (헤르페스 심플렉스 바이러스 및 바리셀라-조스터 바이러스의 치료에 사용됨), 강시클로비르 (gancyclovir) (사이토메갈로 바이러스의 치료에 유용함), 이독수리딘 (idoxuridine), 리바비린 (ribavirin) (호흡기 합포체 바이러스의 치료에 유용함), 디데옥시이노신, 디데옥시시티딘, 및 지도부딘 (아지도티미딘)이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0128] 항진균제는 감염성 진균의 치료 및 예방에 유용하다. 항진균제는 때때로 작용 기작에 의해 분류된다. 일부 항진균제는 글루코스 신타제를 억제함으로써 세포벽 억제제로 작용한다. 여기에는 바시운진 (basiungin)/ECB가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 다른 일부 항진균제는 막 일체성을 불안정화하는 작용을 한다. 여기에는 이미다졸, 예를 들어 클로트리마졸, 세르타콘졸, 플루코나졸, 이트라코나졸, 케토코나졸, 미코나졸 및 보리코나콜뿐 아니라 FK 463, 암포테리신 B, BAY 38-9502, MK 991, 프라디미신, UK 292, 부테나핀, 및 테르비나핀이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 또다른 일부 항진균제는 키틴을 분해하거나 (예, 키티나제) 또는 면역억제 (501 크립)에 의해 작용한다.

[0129] 본 발명의 면역자극성 핵산은 암의 치료를 위해 단독으로, 또는 항암 요법과 함께 사용할 수 있다. 이 방법에는 암이 치료되도록 암에 걸렸거나 발병 위험이 있는 대상에게 유효량의 본 발명의 조합 모티프 면역자극성 핵산을 투여하는 것이 수반된다.

[0130] "암에 걸린 대상"은 검출가능한 암 세포를 갖는 대상이다. 암은 악성 또는 비악성 암일 수 있다. 암 또는 종양에는 담도암; 뇌암; 유방암; 자궁경부암; 용모상피암; 결장암; 자궁내막암; 식도암; 위암; 상피내 신생물; 림프종; 간암; 폐암 (예를 들어, 소세포 및 비소세포성); 흑색종; 신경아종; 구강암; 난소암; 췌장암; 전립선암; 직장암; 육종; 피부암; 고환암; 갑상선암; 및 신장암, 그리고 그 밖의 다른 암종 및 육종이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 한 실시양태에서, 암은 모발상 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 피부 T-세포 백혈병, 다발성 골수종, 여포 림프종, 악성 흑색종, 편평세포암종, 신세포암종, 전립선암종, 방광세포암종 또는 결장암종이다.

[0131] 암은 애완동물 (즉, 고양이 및 개)의 주된 사망 원인 중 하나이다. 개와 고양이에서 흔히 진단되는 악성 질환에는 림프육종, 골육종, 유방 종양, 비만세포종, 뇌종양, 흑색종, 선편평암종, 카르시노이드 폐종양, 기관지선종양, 세기관지 선암종, 섬유종, 점액연골종, 폐육종, 신경육종, 골종, 유두종, 망막모세포종, 유잉 육종, 윌름스 종양, 버키트 림프종, 소교세포종, 신경아종, 과골세포종, 구강 신생물, 섬유육종, 골육종 및 횡문근육종이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 개의 다른 종양에는 생식기 편평세포암종, 전염성 성기 종양, 고환 종양, 정상피종, 세르톨리 세포 종양, 혈관주위세포종, 조직구종, 녹색종 (과립구 육종), 각막 유두종, 각막 편평 세포암종, 혈관육종, 흉막 중피종, 기저 세포 종양, 흉선종, 위 종양, 부신암종, 구강 유두종증, 혈관내피종 및 낭선종이 포함된다. 고양이에서 진단되는 추가 악성 종양에는 여포성 림프종, 장 림프육종, 섬유육종 및 폐 편평 세포암종이 포함된다. 점점 더 인기있는 애완동물 인종축제비에서는 인슐린종, 림프종, 육종, 신경종, 췌장섬 세포 종양, 위 MALT 림프종 및 위 선암종이 발병하는 것으로 공지되어 있다.

[0132] 본 발명의 면역자극성 핵산은 항암 요법과 함께 투여될 수도 있다. 항암 요법에는 암 치료약, 방사선 및 수술 요법이 포함된다. 본 명세서에서, "암 치료약"은 암을 치료할 목적으로 대상에게 투여되는 약제를 말한다. 본 명세서에서는 암 치료를 위한 다양한 종류의 약이 설명된다. 본 명세서의 목적상, 암 치료약은 화학요법제, 면역요법제, 암 백신, 호르몬 요법제, 및 생물학적 반응 조절제로 분류한다.

[0133] 면역자극성 핵산을 모노클로날 항체와 같은 면역요법제와 함께 사용하면, 항체 의존적 세포성 세포독성 (ADCC)의 현저한 증강, NK 세포의 활성화 및 IFN- α 수준의 상승을 비롯한 여러가지 기작을 통해 장기 생존율을 향상시킬 수 있다. ADCC는 면역자극성 핵산을 암 세포와 같은 세포 표적에 특이적인 항체와 함께 사용하여 수행할 수 있다. 면역자극성 핵산을 항체와 함께 대상에게 투여하면, 대상의 면역계는 종양 세포를 죽이도록 유도된다. ADCC 과정에 유용한 항체에는 체내에서 세포와 상호작용하는 항체가 포함된다. 세포 표적에 특이적인 다수의 그러한 항체가 당업계에 보고되어 있으며 많은 것들이 시판되고 있다. 모노클로날 항체와 함께 사용되는 경우 상기 핵산은 생물학적 결과를 달성하는 데 요구되는 항체의 용량을 감축시키는 역할을 한다.

[0134] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 또다른 유형의 화학치료제로는 아미노글루테티미드, 아스파라기나제, 부솔판, 카르보플라틴, 클로롬부실, 시타라빈 HCl, 닥티노마이신, 다우노루비신 HCl, 에스트라무스틴 포스페이트 소듐, 에토포시드 (VP16-213), 플록수리딘, 플루오로우라실 (5-FU), 플루타미드, 히드록시우레아 (히드록시카르바미드), 이포스파미드, 인터페론 Alfa-2a, Alfa-2b, 루프롤리드 아세테이트 (LHRH-방출 인자 유사체), 로무스틴 (CCNU), 메클로레타민 HCl (질소 머스타드), 메르캅토프린, 메스나, 미토탄 (o.p'-DDD), 미톡산트론 HCl, 옥트레오티드, 플리카마이신, 프로카르바진 HCl, 스트렙토조신, 타목시펜 시트레이트, 티오구아닌,

티오테과, 빈블라스틴 술페이트, 암사크린 (m-AMSA), 아자시티딘, 에르트로포이에틴, 헥사메틸멜라민 (HMM), 인터루킨 2, 미토구아존 (메틸-GAG; 메틸 글리옥살 비스-구아닐히드라존; MGBG), 펜토스타틴 (2'-데옥시코포르마인), 세무스틴 (메틸-CCNU), 테니포시드 (VM-26) 및 빈데신 술페이트가 포함된다.

[0135] 암 백신은 암세포에 대한 내부 면역 반응을 자극하려는 의도로 쓰이는 치료약이다. 현재 생산되는 백신은 주로 체액성 면역계 (즉, 항체 의존성 면역 반응)를 활성화한다. 현재 개발중인 다른 백신은 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 T 림프구를 비롯한 세포-매개 면역계를 활성화하는데 초점을 두고 있다. 암 백신은 일반적으로 항원 제시 세포 (예를 들어, 대식세포 및 수지상 세포) 및(또는) 다른 면역 세포 (예를 들어, T 세포, B 세포, 및 NK 세포)를 향한 암 항원의 제시를 증가시킨다.

[0136] 어떤 암세포는 항원성이며, 따라서 면역계에 의해 표적화될 수 있다. 한 측면으로, 면역자극성 핵산과 암 치료약, 특히 암 면역요법제로 분류되는 약물의 병용 투여는 암 항원에 대한 특이적 면역 반응을 자극하는 데 유용하다. 본 명세서에서, "암 항원" 및 "종양 항원"이란 용어는 호환적으로, 암 세포에 의해 차별적으로 발현되며 그에 따라 암 세포를 표적화하기 위해 활용할 수 있는 항원을 말한다. 암 항원은 종양 특이적인 것으로 드러나는 면역 반응을 강력하게 자극할 수 있는 항원이다. 이들 항원 일부는 반드시 발현되지 않는더라도 정상 세포에 의해 코딩된다. 이들 항원은 정상 세포에서 정상적으로는 휴지 상태 (즉, 발현되지 않음)이며 특정한 분화 단계에서만 발현되고, 배아 및 태아 항원과 같이 일시적으로 발현되는 것을 특징으로 한다. 다른 일부 암 항원은 돌연변이 세포 유전자, 예컨대 종양유전자 (예, 활성화된 ras 종양유전자), 서프레서 유전자 (예, 돌연변이 p53)에 의해 코딩되거나, 내부 결실 또는 염색체 전위의 결과 생성된 융합 단백질이다. 또다른 암 항원은 RNA 및 DNA 종양 바이러스에 들어있는 것과 같은 바이러스 유전자에 의해 코딩될 수 있다. "종양-관련" 항원은 종양 세포와 정상 세포에 모두 존재하지만, 종양 세포에서는 상이한 양 또는 상이한 형태로 존재한다. 이러한 항원의 예로는 태아성 종양 항원 (예를 들어, 암태아성 항원), 분화 항원 (예를 들어, T 및 Tn 항원), 및 종양유전자 산물 (예를 들어, HER/neu)이 있다.

[0137] 암 백신에 존재하거나 암 면역요법제를 제조하는 데 사용되는 것과 같은 암 항원은 문헌 [Cohen, et al., 1994, Cancer Research, 54:1055]에 기재된 방법에 따라 암세포 조 추출물로부터 제조하거나, 재조합 기술을 사용하여 항원을 부분 정제하거나, 또는 공지된 항원의 신규 합성에 의해 제조할 수 있다. 암 항원은 특정 항원의 면역원성 부분 형태로 사용될 수 있으며, 어떤 경우에는 전세포 또는 종양 덩어리를 항원으로 사용할 수 있다. 이러한 항원은 재조합 기술로, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 단리 또는 제조할 수 있다.

[0138] 다른 백신은 시험관내에서 암 항원에 노출되어 항원을 프로세싱한 다음, 다른 면역계 세포에 대한 효과적인 항원 제시를 위해 세포 표면의 MHC 분자 환경에 암 항원을 발현시킬 수 있는 수지상 세포 형태를 취한다. 수지상 세포는 항원을 제시함으로써, 또한 국소 환경에 존재하는 LPS와 같은 미생물 분자를 검출하는 패턴 인식 수용체의 발현을 통해 선천성 면역계와 후천성 면역계 사이의 연결을 형성한다

[0139] 본 발명의 조합 모티프 면역자극성 핵산은 천식을 비롯한 알레르기의 치료에 유용하다. 이 조합 모티프 면역자극성 핵산은 알레르기 치료를 위해 단독으로, 또는 알레르기/천식 치료약과 함께 사용할 수 있다. 이 방법은 알레르기 또는 천식 질환이 치료되도록 알레르기 또는 천식 질환에 걸렸거나 발병 위험이 있는 대상에게 유효량의 본 발명의 조합 모티프 면역자극성 핵산을 투여하는 것을 수반한다.

[0140] 본 명세서에서, "알레르기"는 어떤 물질 (알레르겐)에 대한 후천적인 과민성을 말한다. 알레르기성 질환에는 습진, 알레르기성 비염 또는 코감기, 고초열, 기관지 천식, 담마진 (두드러기) 및 음식 알레르기, 및 기타 아토피성 질환이 포함된다. "알레르기에 걸린 대상"은 알레르겐에 반응하여 알레르기 반응을 일으키고 있거나 일으킬 위험이 있는 대상이다. "알레르겐"은 감수성 대상에게서 알레르기성 또는 천식성 반응을 유도할 수 있는 물질을 말한다. 알레르겐의 목록은 무궁무진하며 꽃가루, 곤충독, 동물 비듬, 먼지, 진균 포자 및 약물 (예, 페니실린) 등을 포함할 수 있다.

[0141] 천연의 동물 및 식물 알레르겐의 예로는 다음 속에 특이적인 단백질이 포함된다: 개닌 (Canine) (Canis familiaris); 더마토파고이데스 (Dermatophagoides) (예, Dermatophagoides farinae); 펠리스 (Felis) (Felis domesticus); 암브로시아 (Ambrosia) (Ambrosia artemisiifolia); 롤리움 (Lolium) (예, Lolium perenne 또는 Lolium multiflorum); 크립토메리아 (Cryptomeria) (Cryptomeria japonica); 알터나리아 (Alternaria) (Alternaria alternata); 알더 (Alder); 알누스 (Alnus) (Alnus gultinoasa); 베틀라 (Betula) (Betula verrucosa); 쿠에르쿠스 (Quercus) (Quercus alba); 올레아 (Olea) (Olea europa); 아르테미시아 (Artemisia) (Artemisia vulgaris); 플란타고 (Plantago) (예, Plantago lanceolata); 파리에타리아 (Parietaria) (예, Parietaria officinalis 또는 Parietaria judaica); 블라텔라 (Blattella) (예, Blattella germanica); 아피

스 (Apis) (예, *Apis multiflorum*); 쿠프레수스 (*Cupressus*) (예, *Cupressus sempervirens*, *Cupressus arizonica* 및 *Cupressus macrocarpa*); 유니페루스 (*Juniperus*) (예, *Juniperus sabinoides*, *Juniperus virginiana*, *Juniperus communis* 및 *Juniperus ashei*); 추야 (*Thuja*) (예, *Thuja orientalis*); 카메시파리스 (*Chamaecyparis*) (예, *Chamaecyparis obtusa*); 페리플라네타 (*Periplaneta*) (예, *Periplaneta americana*); 아그로피론 (*Agropyron*) (예, *Agropyron repens*); 세칼레 (*Secale*) (예, *Secale cereale*); 트리티쿰 (*Triticum*) (예, *Triticum aestivum*); 닥틸리스 (*Dactylis*) (예, *Dactylis glomerata*); 페스투카 (*Festuca*) (예, *Festuca elatior*); 포아 (*Poa*) (예, *Poa pratensis* 또는 *Poa compressa*); 아베나 (*Avena*) (예, *Avena sativa*); 홀쿠스 (*Holcus*) (예, *Holcus lanatus*); 안톡산툼 (*Anthoxanthum*) (예, *Anthoxanthum odoratum*); 아레나테룸 (*Arrhenatherum*) (예, *Arrhenatherum elatius*); 아그로스티스 (*Agrostis*) (예, *Agrostis alba*); 플레움 (*Phleum*) (예, *Phleum pratense*); 팔라리스 (*Phalaris*) (예, *Phalaris arundinacea*); 파스팔룸 (*Paspalum*) (예, *Paspalum notatum*); 소르굼 (*Sorghum*) (예, *Sorghum halepensis*); 및 브로무스 (*Bromus*) (예, *Bromus inermis*).

- [0142] 본 명세서에서, "천식"은 염증, 기도의 협소화 및 흡입된 물질에 대한 기도의 반응성 증가를 특징으로 하는 호흡기계의 질환을 말한다. 천식은, 완전히는 아니지만 흔히, 아토피 또는 알레르기 증상과 연관된다.
- [0143] 본 명세서에서, "천식/알레르기 치료약"은 알레르기 또는 천식 반응의 증상을 감소시키거나, 알레르기 또는 천식 반응을 억제하거나, 알레르기 또는 천식 반응의 발현을 방지하는 화합물 또는 조성물이다. 천식 및 알레르기 치료를 위한 각종 치료약이 본 명세서의 내용에 포함시키기로 하는 문헌[Guidelines For The Diagnosis and Management of Asthma, Expert Panel Report 2, NIH Publication No. 97/4051, Jul. 19, 1997]에 기재되어 있다. 상기 NIH 출원문에 기재된 치료약의 요약은 아래에 제시한다.
- [0144] 대부분의 실시태양에서, 천식/알레르기 치료약은 어느 정도까지는 천식과 알레르기 둘 다를 치료하는 데 유용하다. 일부 천식/알레르기 치료약은 바람직하게는 천식을 치료하기 위해 면역자극성 핵산과 함께 사용된다. 이들을 천식 치료약이라 칭한다. 천식 치료약은 PDE-4 억제제, 기관지확장제/베타-2 아고니스트, K⁺ 채널 개방제, VLA-4 길항제, 뉴로킨 길항제, TXA2 합성 억제제, 잔타닌, 아라키돈산 길항제, 5 리폭시게나제 억제제, 트롬복산 A2 수용체 길항제, 트롬복산 A2 길항제, 5-리폭시게나제 활성화 단백질의 억제제 및 프로테아제 억제제를 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다.
- [0145] 다른 일부 천식/알레르기 치료약은 바람직하게는 알레르기를 치료하기 위해 면역자극성 핵산과 함께 사용된다. 이들을 알레르기 치료약이라 칭한다. 알레르기 치료약은 항-히스타민제, 스테로이드, 면역조절제, 및 프로스타글란딘 유도제를 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다. 항-히스타민제는 비만 세포 또는 호염기구에서 방출되는 히스타민에 길항작용을 하는 화합물이다. 이들 화합물은 당업계에 잘 알려져 있으며, 알레르기 치료를 위해 흔히 사용된다. 항-히스타민제는 로라티딘, 세티리진, 부클리진, 세테리진 동족체, 팩소페나딘, 테르페나딘, 데스로라타딘, 노라스테미졸, 에피나스틴, 에바스틴, 아스테미졸, 레보카바스틴, 아젤라스틴, 트라닐라스트, 테르페나딘, 미졸라스틴, 베타타스틴, CS 560 및 HSR 609를 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다. 프로스타글란딘 유도제는 프로스타글란딘 활성을 유도하는 화합물이다. 프로스타글란딘은 평활근 이완을 제어함으로써 작용한다. 프로스타글란딘 유도제는 S-5751을 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다.
- [0146] 스테로이드는 베클로메타손, 플루티카손, 트람시놀론, 부테소나이드, 코르티코스테로이드 및 부테소나이드를 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다. 면역자극성 핵산과 스테로이드의 조합은 어린 대상 (예, 아동)의 치료에 특히 적합하다. 지금까지는, 아동에 대한 스테로이드의 사용은 일부 스테로이드 치료가 보고된 바에 따르면 성장 지연과 연관된다는 소견에 의해 제한되었다. 따라서, 본 발명에 의하면 면역자극성 핵산을 성장 지연 스테로이드와 함께 사용할 수 있고, 그에 따라 "스테로이드 절약 효과"를 제공할 수 있다. 이들 두 약제의 조합은 스테로이드에 대해 요구되는 용량이 더 낮아지는 결과를 가져올 수 있다.
- [0147] 면역조절제는 항염증제, 류코트리엔 길항제, IL4 뮤테인, 가용성 IL-4 수용체, 면역억제제 (저항성 펩티드 백신 같은 것), 항-IL-4 항체, IL-4 길항제, 항-IL-5 항체, 가용성 IL-13 수용체-Fc 융합 단백질, 항-IL-9 항체, CCR3 길항제, CCR5 길항제, VLA-4 억제제 및 IgE의 하향조절제로 구성된 군을 포함하나, 여기에 한정되지는 않는다.
- [0148] 본 발명의 면역자극성 핵산은 제1형 IFN, 즉 IFN- α 및 IFN- β 를 유도하는 데 사용할 수 있다. 이 방법은 제1형 IFN을 발현할 수 있는 세포를 유효량의 본 발명의 조합 모티프 면역자극성 핵산과 접촉시켜 그 세포에 의한 제1형 IFN 발현을 유도하는 것을 포함한다. 최근에 와서, 인간의 경우 IFN- α 의 주된 생산 세포 유형이 형질세포양 수지상 세포 (pDC)라는 것이 알려졌다. 이 유형의 세포는 PBMC 중에 매우 낮은 빈도 (0.2-0.4 %)로 존재

하며, CD4, CD123 (IL-3R α) 및 제II형 주요 조직적합성 복합체 (MHC 클래스 II)에 대해서는 양성인 반면 계통 음성이고 (즉, CD3, CD14, CD19, 또는 CD56에 대해 음성) CD11c 음성인 표현형을 특징으로 한다 [Grouard G et al. (1997) J Exp Med 185:1101-11; Rissoan M-C et al. (1999) Science 283:1183-6; Siegal F P et al. (1999) Science 284:1835-7; Cella M et al. (1999) Nat Med 5:919-23]. 제1형 IFN을 측정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 여기에는 효소 연결 면역흡착 분석법 (ELISA), 생검, 및 형광 활성화 세포 분석법 (FACS) 등이 포함된다. 이런 종류의 분석법은 쉽게 구할 수 있는 시판 시약 및 키트를 사용하여 수행할 수 있다.

[0149] 본 발명의 면역자극성 핵산은 NK 세포를 활성화시키는 데 사용할 수 있다. 이 방법은 NK 세포를 유효량의 본 발명의 조합 모티프 면역자극성 핵산과 접촉시켜 NK 세포를 활성화시키는 것을 포함한다. NK 세포의 활성화는 직접 활성화 또는 간접 활성화일 수 있다. 간접 활성화는 후속적으로 NK 세포의 활성화를 유발하는 사이토카인 또는 다른 인자들의 유도를 말한다. NK 세포 활성화는 세포용해 활성의 측정, CD69와 같은 활성화 표지의 유도의 측정, 및 특정 사이토카인의 유도의 측정 등 여러가지 방법으로 계량할 수 있다. 특정한 종양 표적을 자발적으로 죽이는 특징적인 능력 외에도, NK 세포는 ADCC에 참여하며, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF 및 IL-3의 주된 생산자이다.

[0150] 마우스 NK 세포에 대한 원형적인 NK-감수성 세포 표적은 몰로니 바이러스에 감염된 A 변종 마우스에서 유래한 흉선종인 효모 인공 염색체 (YAC)-1이다. 인간 NK 세포의 경우, 표준 표적은 적백혈병 계통에서 유래한 세포주인 K562이다. 마이크로타이터 플레이트에서, 일정한 수의 방사선표지된 표적 (예, ⁵¹Cr-표지된 K562)을 단독으로 (자발적), 세제를 첨가하여 (최대치), 또는 여러가지 상이한 수의 효과 세포와 함께 (실험) 배양한다. 표적 세포에 대한 효과 세포의 비를 E:T 비라고 부른다. 농축되고 활성화된 NK 세포는 대개 10:1 미만의 E:T 비에서 유효한 반면, 미분획 PBMC 또는 비장세포의 경우에는 100:1 이상의 E:T 비가 필요했다.

[0151] 면역자극성 핵산은 전신 및(또는) 점막 면역 반응을 유도하기 위한 보조제로도 유용하다. 본 발명의 조합 모티프 면역자극성 핵산은 항원에 노출된 대상에게 전달하여 그 항원에 대해 증강된 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 따라서, 예를 들어 조합 모티프 면역자극성 핵산은 백신 보조제로 유용하다.

[0152] 면역자극성 핵산은 비핵산 보조제와 함께 투여할 수 있다. 비핵산 보조제는 체액성 및(또는) 세포성 면역 반응을 자극할 수 있는, 본 명세서에 기재된 면역자극성 핵산을 제외한 임의의 분자 또는 화합물이다. 비핵산 보조제에는 예를 들어 데포 (depo) 효과를 발생시키는 보조제, 면역자극 보조제, 및 데포 효과를 발생시키면서 면역계를 자극하는 보조제가 포함된다. 본 명세서에서, 비핵산 점막 보조제는 항원과 함께 점막 표면에 투여되었을 때 대상에게서 점막 면역 반응을 유도할 수 있는, 면역자극성 핵산 이외의 보조제이다.

[0153] 본 발명의 면역자극성 핵산은 제약상 허용되는 담체에 넣어 제약 조성물로 제제화할 수 있다. 이 면역자극성 핵산은 대상에게 직접 투여되거나 또는 핵산 전달 복합체와 함께 투여될 수 있다. 핵산 전달 복합체는 표적화 수단 (예를 들어, 표적 세포 (예를 들어, B 세포 표면)에 대한 더 고친화도의 결합 및(또는) 표적 세포에 의한 세포내 흡수의 증가를 가져오는 분자)과 (예를 들어, 이온 결합 또는 공유 결합에 의하거나 또는 그 안에 둘러싸여) 연합되어 있는 핵산 분자를 의미한다. 핵산 전달 복합체의 예로는 스테롤 (예를 들어, 콜레스테롤), 지질 (예를 들어, 양이온성 지질, 비로솜 또는 리포솜), 또는 표적 세포 특이적 결합제 (예를 들어, 표적 세포 특이적 수용체에 의해 인식되는 리간드)와 연합되어 있는 핵산이 포함된다. 바람직한 복합체는 생체내에서 충분히 안정성이 있어서 표적 세포에 의한 내부화 이전에 상당한 결합 해체가 일어나는 것을 방지할 수 있다. 그러나, 복합체는 핵산이 기능을 갖춘 형태로 방출되도록 세포내의 적절한 조건하에서 절단될 수 있다.

[0154] 면역자극성 핵산 및(또는) 항원 및(또는) 다른 치료제는 단독으로 (예를 들어, 염수 또는 완충액 중), 또는 당업계에 공지된 임의의 전달 비히클을 이용하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 다음과 같은 전달 비히클이 알려져 있다: 코클레이트 (Cochleate) (Gould-Fogerite et al., 1994, 1996); 에멀젼 (Emulsome) (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1997); ISCOM (Mowat et al., 1993, Carlsson et al., 1991, Hu et al., 1998, Morein et al., 1999); 리포솜 (Childers et al., 1999, Michalek et al., 1989, 1992, de Haan 1995a, 1995b); 마이크로스피어 (Gupta et al., 1998, Jones et al., 1996, Maloy et al., 1994, Moore et al., 1995, O'Hagan et al., 1994, Eldridge et al., 1989); 중합체 (예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 키토산) (Hamajima et al., 1998, Jabbal-Gill et al., 1998); 중합체 고리 (Wyatt et al., 1998); 프로테오솜 (Vancott et al., 1998, Lowell et al., 1988, 1996, 1997); 비로솜 (Gluck et al., 1992, Mengiardi et al., 1995, Cryz et al., 1998); 바이러스-유사 입자 (Jiang et al., 1999, Leibl et al., 1998). 다른 전달 비히클도 당업계에 공지되어 있다.

- [0155] 점막 또는 국소 전달을 위한 본원에 기재된 화합물의 대상 투여량은 통상적으로 1회 투여 당 약 0.1 μg 내지 10 mg의 범위이며, 투여는 용도에 따라 매일, 매주, 또는 매월, 및 이 사이의 임의의 다른 시간 간격으로 제공될 수 있다. 보다 통상적으로, 점막 또는 국소 투여량은 1회 투여 당 약 10 μg 내지 5 mg, 가장 통상적으로는 약 100 μg 내지 1 mg이며, 며칠 또는 몇주 간격으로 2 내지 4회 투여할 수 있다. 보다 통상적으로, 면역 자극제의 투여량은 일 또는 주 단위로 투여하면서 1회 투여 당 1 μg 내지 10 mg, 가장 통상적으로는 10 μg 내지 1 mg이다. 항원특이적 면역 반응을 유도하기 위해 비경구 전달되는 본원에 기재된 화합물 (항원과 함께 전달되거나 다른 치료제와 함께는 아님)의 대상 투여량은 백신 보조제 또는 면역 자극제 용도로 유효한 점막 투여량보다 통상 5 내지 10,000배, 보다 통상적으로 10 내지 1,000배, 가장 통상적으로는 20 내지 100배 더 높다. 선천성 면역 반응을 유도하거나, ADCC를 증가시키거나 또는 항원 특이적 면역 반응을 유도하기 위해 비경구로 전달되는 본원에 기재된 화합물의 투여량은, 면역자극성 핵산을 다른 치료제와 함께 또는 특수한 전달 비히클에 넣어 투여하는 경우, 통상적으로는 1회 투여 당 약 0.1 μg 내지 10 mg이며, 투여는 용도에 따라 매일, 매주 또는 매월, 및 이 사이의 임의의 다른 시간 간격으로 제공될 수 있다. 보다 통상적으로, 이러한 목적을 위한 비경구 투여량은 1회 투여 당 약 10 μg 내지 5 mg, 가장 통상적으로는 약 100 μg 내지 1 mg이며, 며칠 또는 몇주 간격으로 2 내지 4회 투여된다. 그러나, 어떤 실시양태에서는 이러한 목적을 위한 비경구 투여량이 상기 기술된 통상적인 투여량의 5 내지 10,000배 더 높은 범위로 사용될 수 있다
- [0156] 본 명세서에서, "유효량"은 목적하는 생물학적 효과를 실현하는 데 필요하거나 충분한 양을 말한다. 예를 들어, 감염증을 치료하기 위한 면역자극성 핵산의 유효량은 감염증을 치료하는 데 필요한 양이다. 본원에 제공된 교시 내용을 고려하고, 다양한 활성 화합물 중에서 선택하고, 효능, 상대적인 생체이용성, 환자의 체중, 부작용의 심각성 및 바람직한 투여 방식과 같은 요소를 감안하면, 실질적인 독성을 유발하지 않으면서도 특정 대상의 치료에 완전히 효과적인 예방 또는 치료 처치법을 설계할 수 있다. 어떤 특정한 경우에 대한 유효량은 치료 대상 질병 또는 증상, 투여되는 특정 면역자극성 핵산, 항원, 대상의 체격, 또는 질병 또는 증상의 경중과 같은 요소에 따라 다를 수 있다. 당업자라면 과도한 실험 없이도 특정 면역자극성 핵산 및(또는) 항원 및(또는) 다른 치료제의 유효량을 실험적으로 결정할 수 있을 것이다.
- [0157] 본원에 기재된 모든 화합물에 대해, 치료 유효량은 먼저 동물 모델로부터 결정할 수 있다. 점막 또는 국소 투여를 위한 치료 유효량은 또한 인간에게 시험된 (인간에 대한 임상 시험이 시작되었음) CpG 올리고뉴클레오타이드, 및 유사한 제약 활성을 나타내는 것으로 알려진 화합물, 예를 들어 다른 점막 보조제, 예컨대 LT 및 백신접종을 위한 다른 항원에 대한 인간 데이터로부터 결정할 수 있다. 비경구 투여를 위해서는 투여량이 많아야 한다. 적용되는 투여량은 투여되는 화합물의 상대적인 생체이용성 및 효능을 기초로 조정될 수 있다. 상기 기재된 방법 및 당업계에 잘 알려진 다른 방법을 기초로 하여 최대 효과를 달성하도록 투여량을 조절하는 것은 당업자에게는 용이한 일이다.
- [0158] 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 용액으로 투여되며, 이 용액은 통상적으로, 제약상 허용되는 농도의 염, 완충제, 보존제, 적합한 담체, 보조제, 및 경우에 따라 다른 치료 성분을 함유할 수 있다.
- [0159] 치료법에 사용되는 경우, 유효량의 면역자극성 핵산은 핵산을 목적하는 표면, 예를 들어 점막, 전신으로 전달하는 임의의 방식에 의해 대상에게 투여될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물의 투여는 당업자에게 알려진 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 투여 경로에는 경구, 비경구, 근육내, 비강내, 기관지내, 흡입, 안내, 설하, 질내 및 직장내 투여가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.
- [0160] 경구 투여의 경우, 화합물 (즉, 면역자극성 핵산, 항원 및 다른 치료제)은 활성 화합물을 당업계에 공지된 제약상 허용되는 담체와 함께 배합하여 쉽게 제제화할 수 있다. 이러한 담체는 치료 대상에 의한 경구 사용을 위해 본 발명의 화합물이 정제, 환제, 당의정제, 캡셀제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리 및 현탁액제 등으로 제제화되도록 할 수 있다. 경구 사용을 위한 제약 제제는, 고상 부형제와 혼합하고, 경우에 따라 생성 혼합물을 분쇄하고, 원한다면 적절한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정 코어를 얻음으로써 얻을 수 있다. 적합한 부형제로는 특히, 락토스, 수크로스, 만니톨, 소르비톨을 비롯한 당; 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸쓰 검, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 및(또는) 폴리비닐피롤리돈 (PVP) 등과 같은 셀룰로스 제제 등의 충전제가 있다. 원한다면, 가교결합된 폴리비닐 피롤리돈, 아가, 또는 알긴산 또는 그의 염, 예컨대 알긴산나트륨과 같은 붕해제를 첨가할 수 있다. 경우에 따라, 경구 제제는 내부의 산성 상태를 중화시키기 위해 염수 또는 완충액 중에서 제제화될 수도 있고, 담체가 전혀 없이 투여될 수도 있다.
- [0161] 당의정제 코어에는 적합한 코팅을 제공한다. 이를 위해, 농축된 당 용액을 사용할 수 있는데, 여기에는 경우에

따라 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카르보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜, 및(또는) 이산화티탄, 래커 용액 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유시킬 수 있다. 염료 또는 안료는 구분을 위해, 또는 활성 화합물 용량의 여러가지 조합을 특성화하기 위해 정제 또는 당의정 코팅에 첨가될 수 있다.

[0162] 경구적으로 사용될 수 있는 제약 제제로는 젤라틴 소재의 푸쉬-핏 (push-fit) 캡셀제뿐 아니라 젤라틴 및 가소제, 예컨대 글리세롤 또는 소르비톨 소재로 된 연질의 밀봉 캡셀제 등이 있다. 푸쉬-핏 캡셀제는 활성 성분을 락토스와 같은 충전제, 전분과 같은 결합제 및(또는) 탈크 또는 스테아르산마그네슘과 같은 활제 및 경우에 따라서는 안정화제와 혼합된 상태로 함유할 수 있다. 연질 캡셀에서는, 활성 화합물을 적절한 액체, 예를 들어 지방 오일, 액상 과라핀, 또는 액상 폴리에틸렌 글리콜에 용해 또는 현탁시킬 수 있다. 또한, 안정화제를 첨가할 수 있다. 경구 투여용으로 제제화된 마이크로스피어를 사용할 수도 있다. 이러한 마이크로스피어는 당업계에서 잘 정의되어 있다. 경구 투여용의 모든 제제는 이 투여 방식에 적합한 투여량으로 되어 있어야 한다.

[0163] 경구 점막 투여의 경우, 조성물은 통상의 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지 형태일 수 있다.

[0164] 흡입에 의한 투여의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은, 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압된 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 분무 제형으로 편리하게 전달될 수 있다. 가압된 에어로졸의 경우, 투여 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하는, 젤라틴 등으로 된 캡셀 및 카트리지는 화합물 및 적합한 분말 기체, 예를 들어 락토스 또는 전분의 분말 혼합물을 함유하도록 제제화할 수 있다.

[0165] 전신으로 전달하는 것이 바람직한 경우, 화합물은 주사, 예를 들어 환약 주사 또는 지속적 주입에 의한 비경구 투여용으로 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플, 또는 다회 투여용 용기로, 보존제가 첨가된 상태로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있으며, 현탁제, 안정화제 및(또는) 분산제와 같은 제제화 물질을 함유할 수 있다.

[0166] 비경구 투여를 위한 제약 제제에는 수용성 형태의 활성 화합물 수용액이 포함된다. 또한, 활성 화합물의 현탁액을 적합한 유성 주사 현탁액으로서 제조할 수 있다. 적합한 지질친화성 용매 또는 비히클에는 지방 오일, 예를 들어 참깨 기름, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트 또는 트리글리세라이드, 또는 리포솜이 포함된다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예를 들어 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 소르비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 경우에 따라서는, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 농축 용액의 제조를 가능케 하는 적합한 안정화제 또는 물질을 함유할 수도 있다.

[0167] 또는, 활성 화합물은 사용시에 적합한 비히클, 예를 들어 멸균 무발열원 물로 녹여 사용하는 분말 형태일 수 있다.

[0168] 화합물은 예를 들어 코코아 버터 또는 기타 글리세라이드와 같은 통상의 좌약 기체를 함유하는 좌제 또는 보유관장제와 같은 직장 또는 질내 투여용 조성물로 제제화할 수도 있다.

[0169] 상기 기술된 제제 이외에, 화합물은 데포 (depot) 제제로 제제화할 수도 있다. 이러한 장기 작용성 제제는 적합한 고분자 또는 소수성 물질을 써서 (예를 들어, 허용가능한 오일 중 에멀전으로서), 또는 이온교환수지를 써서, 또는 난용성 유도제, 예컨대 난용성 염으로 제제화할 수 있다.

[0170] 제약 조성물은 또한 적합한 고상 또는 겔상 담체 또는 부형제를 포함할 수도 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예는 탄산칼슘, 인산칼슘, 각종 당, 전분, 셀룰로스 유도제, 젤라틴, 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0171] 적합한 액상 또는 고상 제약 제제 형태로는, 예를 들어 흡입용 수용액 또는 염수 용액 형태, 미세캡셀화 형태, 코클리에이트화 형태, 미세한 금 입자상에 코팅된 형태, 리포솜내에 함유된 형태, 분무, 에어로졸 형태, 피부에 이식되는 펠릿 형태, 또는 피부를 스크래치하는 날카로운 물건상에 건조부착된 형태가 있다. 제약 조성물은 또한 과립, 분말, 정제, 코팅 정제, (미세)캡셀, 좌제, 시럽, 에멀전, 현탁액, 크림, 점적제 또는 활성 화합물을 연장 방출시키는 제제를 포함하며, 이들 제제 중에 부형제 및 첨가제 및(또는) 보조제, 예를 들어 붕해제, 결합제, 코팅제, 팽창제, 활제, 향미제, 감미제 또는 가용화제를 상기 설명된 바와 같이 통상적으로 사용한다. 제약 조성물은 다양한 약물 전달 시스템에 사용하기에 적합하다. 약물 전달 방법에 대한 개략적인 검토를 위해서는, 본 명세서의 내용에 포함시키기로 하는 문헌 [Langer, Science 249: 1527-1533, 1990]을 참조한다.

[0172] 면역자극성 핵산, 및 경우에 따라서는 다른 치료제, 및(또는) 항원은 그 자체로 (순수), 또는 제약상 허용되는

염 형태로 투여될 수 있다. 의약으로 사용되는 경우, 염은 제약상 허용되 것이어야 하지만, 제약상 허용되는 염을 제조하는 데 제약상 허용되지 않는 염을 편리하게 사용할 수 있다. 이러한 염으로는 하기 산으로부터 제조되는 것들이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다: 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔 술폰산, 타르타르산, 시트르산, 메탄술폰산, 포름산, 말론산, 숙신산, 나프탈렌-2-술폰산, 및 벤젠술폰산. 이러한 염은 또한 알칼리금속염 또는 알칼리토금속염, 예를 들어 카르복실산기의 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염 형태로 제조할 수 있다.

[0173] 적합한 완충제에는 다음의 것들이 포함된다: 아세트산 및 그의 염 (1-2 % w/v); 시트르산 및 그의 염 (1-3 % w/v); 붕산 및 그의 염 (0.5-2.5 % w/v); 및 인산 및 그의 염 (0.8-2 % w/v). 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드 (0.003-0.03 % w/v); 클로로부탄올 (0.3-0.9 % w/v); 파라벤 (0.01-0.25 % w/v) 및 티메로살 (0.004-0.02 % w/v) 등이 있다.

[0174] 본 발명의 제약 조성물은 경우에 따라서는 제약상 허용되는 담체 중에 포함된 유효량의 면역자극성 핵산 및 경우에 따라서는 항원 및(또는) 다른 치료제를 함유한다. "제약상 허용되는 담체"라는 용어는 인간 또는 다른 척추동물에 투여하기에 적합한 한가지 이상의 상용성 고상 또는 액상 충전제, 희석제 또는 캡셀화 물질을 의미한다. "담체"라는 용어는 활성 성분이 배합되어 투여가 용이해지는 천연 또는 합성의 유기 또는 무기 성분을 의미한다. 제약 조성물의 성분은 또한 상호작용이 없도록 하는 방식으로 본 발명의 화합물과, 그리고 그러한 성분들끼리 혼합될 수 있다.

[0175] 대상을 치료하고자 할 때, 화합물의 활성, 투여 방식, 면역화의 목적 (즉, 예방 또는 치료), 질환의 특성 및 경중, 대상의 연령 및 체중에 따라 서로 다른 투여량이 필요할 수 있다. 주어진 양의 투여는 개별 투여 단위 형태 또는 이보다 작은 여러 개의 투여 단위들로 1회 투여에 의해 수행할 수 있다. 항원-특이적 반응을 자극하는 데는 몇주 또는 몇개월의 특정 간격으로 투여량을 다중 투여하는 것이 일반적이다.

[0176] 다른 전달 시스템에는 시간에 따른 방출, 지연 방출 또는 지속적 방출 전달 시스템이 포함될 수 있다. 이러한 시스템은 화합물의 반복적인 투여를 회피할 수 있어서 환자 및 의사의 편의성을 향상시킨다. 많은 유형의 방출 전달 시스템을 이용할 수 있으며, 이는 당업자에게 공지되어 있다. 그 예로는 중합체 기재 시스템, 예를 들어 폴리(락티드-글리콜라이드), 코폴리옥살레이트, 폴리카프로락톤, 폴리에스테르아미드, 폴리ortho에스테르, 폴리히드록시부티르산, 및 폴리안히드라이드가 있다. 약물을 함유하는 상기 중합체로 된 미세캡셀은 예를 들어 미국 특허 제5,075,109호에 기재되어 있다. 전달 시스템에는 다음과 같은 비중합체 시스템도 포함된다: 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르와 같은 스테롤 및 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드와 같은 지방산 또는 중성 지방을 비롯한 지질; 히드로겔 방출 시스템; 실라스틱 시스템; 펩티드 기재 시스템; 왁스 코팅; 통상의 결합제 및 부형제를 사용한 압축 정제; 및 부분적으로 용해된 이식물 등. 구체적인 예로는 다음과 같은 것들이 있지만 이에 한정되지 않는다: (a) 본 발명의 물질이 미국 특허 제4,452,775호, 동 제4,675,189호, 및 동 제5,736,152호에 기재된 것과 같은 매트릭스내 형태에 포함되어 있는 부식 시스템; 및 (b) 활성 성분이 미국 특허 제 3,854,480호, 동 제5,133,974호 및 동 제5,407,686호에 기재된 바와 같이 중합체로부터 조절된 속도로 투과해나오는 확산 시스템. 또한, 펌프계 하드웨어 전달 시스템을 사용할 수도 있는데, 그 중 몇몇은 이식에 적합하다.

[0177] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되지만, 실시예는 본 발명을 제한하기 위한 것은 아니다. 본원을 통해 인용된 참고문헌 (참고문헌, 특허, 공개된 특허 출원 및 동시 계류중인 특허 출원 포함)의 전체 내용은 본 명세서 내용에 포함시키고자 함을 명시하는 바이다.

실시예

[0178] 실시예 1: ODN 2395는 NK 세포 및 IFN- α 생산의 현저히 강력한 활성화제이다.

[0179] 본 발명자들은 이전에 CGCGCG와 같이 서열 CG가 반복되어 이루어지거나 CG 앞에 C가 오고(오거나) 뒤에 G가 오는 중화 모티프를 포함하고 있는 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN)를 알아내고 설명한 바 있다. 이들 중화 모티프는 IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α 의 분비 및 항원 특이적 면역 반응의 유도과 같은 여러가지 결과에 대한 ODN의 자극 효과를 감소시킨다고 여겨졌다 [Krieg A M et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:12631-6].

[0180] 많은 경우, 올리고뉴클레오티드에 자극 모티프와 함께 중화 모티프가 존재하면 면역 활성화를 방지한다고 여겨졌다. 자극 모티프와 중화 모티프를 모두 갖는 그러한 ODN 중 하나가 다음 서열을 갖는 ODN 2136이다: TCCTGACGTTGCGCGCGCGCC (서열 19). 이 ODN의 3' 말단에는 억제성 ODN 2010 (GCGGGGGCGCGCGCGCC, 서열 38)의 3' 말단에서 유도된 상당히 전형적인 중화 모티프, CGGCGCGCGCC (서열 37)가 들어 있다. 놀랍게도, ODN

2136은 NK 세포 용해 활성 (용해 단위 L.U.) 유도에 강한 활성을 보였다. 아래 표 1에 제시된 바와 같이, 3 µg/ml 농도의 ODN 2136은 실제로 L. U. 유도에 대해 표준 B-세포 및 NK 세포 자극성 포스포티오에이트 ODN 2006 (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT, 서열 39)보다 강력했다. 더욱 놀랍게도, ODN 2006은 2,396 pg/ml의 IFN-α 생산을 유도하는 데 그친 반면 ODN 2136은 14,278 pg/ml의 생산을 유도하였다 (도 1). 이것은 놀랍게도 이 중화 서열의 존재가 반드시 피해야 할 것은 아님을 말해준다.

표 1

[0181] 각종 ODN과 함께 하룻밤 배양한 인간 PBL

ODN	E:T 비율						L.U.
	3.1	6.3	12.5	25.0	50.0	100.0	
단독	0.86	1.47	4.15	7.25	11.66	18.57	0.13
IL-2 (100 U/ml)	12.21	29.21	46.63	67.88	78.28	76.65	33.26
1585 (3 µg/ml)	6.47	12.61	24.65	36.82	49.30	53.00	11.69
1585 (10 µg/ml)	8.52	18.17	33.20	51.26	72.13	73.89	20.94
1585 (30 µg/ml)	5.75	13.05	20.00	34.34	45.02	56.49	10.66
2118 (10 µg/ml)	0.62	2.08	3.90	8.53	12.79	15.93	0.09
2006 (0.6 µg/ml)	1.62	2.88	8.24	14.10	21.85	31.91	1.73
2006 (3 µg/ml)	7.07	17.02	30.28	50.66	69.13	74.27	19.41
2169 (0.6 µg/ml)	3.65	3.81	6.67	13.45	24.48	32.42	1.84
2169 (3 µg/ml)	11.20	21.47	38.15	59.66	78.96	77.72	25.76
1760 (0.6 µg/ml)	0.35	2.70	6.85	8.59	16.09	20.63	0.33
1760 (3 µg/ml)	7.57	12.94	27.50	46.63	62.43	66.97	16.60
1758 (0.6 µg/ml)	2.07	6.05	12.80	23.25	34.57	44.93	5.43
1758 (3 µg/ml)	8.40	17.84	33.41	52.20	69.52	74.46	20.78
2398 (0.6 µg/ml)	1.83	1.92	6.21	11.21	20.38	26.71	0.98
2398 (3 µg/ml)	4.36	12.90	24.10	42.37	60.51	70.03	15.02
2397 (0.6 µg/ml)	2.14	3.15	8.79	17.37	28.71	42.45	3.80
2397 (3 µg/ml)	10.09	22.52	38.96	61.85	77.69	74.87	26.12
2396 (0.6 µg/ml)	2.93	5.80	13.22	25.32	36.83	46.77	6.13
2396 (3 µg/ml)	9.03	18.65	32.71	54.62	72.62	73.67	21.64
2395 (0.6 µg/ml)	5.10	9.22	17.21	31.67	49.53	60.53	10.59
2395 (3 µg/ml)	10.91	24.55	40.42	61.23	71.11	75.52	26.94
2136 (0.6 µg/ml)	0.39	2.89	7.12	12.70	18.88	24.11	0.78
2136 (3 µg/ml)	11.94	23.57	39.11	55.16	70.84	71.99	25.62

[0182] 표 1의 ODN 서열

[0183] 1585 GGGTCAACGTTGAGGGGG (서열 35)

[0184] 1758 TCTCCAGCGTGCGCCAT (서열 40)

[0185] 1760 ATAATCGACGTTCAAGCAAG (서열 41)

[0186] 2006 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 39)

[0187] 2118 GGGTCAAGCTTGAGGGGG (서열 36)

[0188] 2136 TCCTGACGTTCCGGCGCGCCC (서열 19)

[0189] 2169 TCTATCGACGTTCAAGCAAG (서열 42)

[0190] 2395 TCGTCGTTTTCCGGCGCGCCG (서열 1)

[0191] 2396 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 43)

[0192] 2397 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTTT (서열 44)

[0193] 2398 TTCGTGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 45)

[0194] 그러나, 이 관찰 결과를 이해하려는 과정에서 ODN 2136의 3' 말단을 ODN 2006의 5' 말단과 결합시켜 더욱 강력한 NK 활성화제 및 IFN- α 유도 인자를 만들어내었다. 그 결과 얻어진 ODN 2395 (TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCG, 서열 1)는 우연히도 3' 말단에 있는 마지막 염기가 C에서 G로 바뀌어 있었다. 이 단일 염기 변화의 결과, ODN 2395의 3' 말단에 완전한 12개 염기 길이의 팔린드롬이 만들어지게 되었다. 이에 반해 ODN 2136에서는 이 팔린드롬이 10개 염기 길이에 그친다.

[0195] 표 2는 NK 세포 L.U. 유도에 대하여 ODN 2395가 대부분의 다른 모든-포스포로티오에이트 골격 ODN에 비해 현저히 강력하다는 데이터의 또다른 예를 보여준다. 이 분석에서 ODN 2395는 키메라 포스포로티오에이트/포스포디에스테르 (SOS) 골격을 갖는 양성 대조군인 ODN 1585보다는 약하다. ODN 1585 (ggGGTCAACGTTGAgggggG, 서열 35)는 국제특허공개 제01/22990호에 기재되어 있다. 이 실험에서 시험한 0.6 μ g/ml의 저농도에서, ODN 2136은 ODN 비함유 대조군의 0.03이라는 배경치보다 높게 L.U.를 유도하지 못했다. 도 2 및 도 3은 각각 표 2의 NK 세포 배양물에서 얻은 상청액 중 단핵구 주화성 단백질 (MCP)-1 및 IFN-유도성 단백질 (IP)-10의 농도를 보여준다. MCP-1은 CCR2에 대한 리간드이면서 Th1 및 Th2-형 면역 반응 양쪽에 연관된 케모카인이다. IP-10은 CXCR3에 대한 리간드이면서 Th1 반응에 연관된 CXC 케모카인이다 [Loetscher P et al. (2001) J Biol Chem 276: 2986-91]. 이들 데이터는 ODN 2395가 비교적 강력한 IP-10 생산 유도 인자이나, MCP-1에 대해서는 평균적 수준을 유도하는 데 그친다는 것을 보여준다.

표 2

[0196] 각종 ODN과 함께 하룻밤 배양한 인간 PBL

ODN	E:T 비율						L.U.
	3.1	6.3	12.5	25.0	50.0	100.0	
단독	1.73	3.10	4.25	7.72	12.07	14.56	0.03
IL-2 (100 U/ml)	16.68	29.41	49.42	74.78	87.64	92.63	37.17
1585 (10 μ g/ml)	9.60	17.25	35.63	55.76	77.53	87.14	22.94
2118 (10 μ g/ml)	2.99	2.88	3.41	6.72	9.26	14.18	0.01
2183 (0.6 μ g/ml)	2.13	2.28	3.29	8.17	10.47	17.87	0.07
2186 (0.6 μ g/ml)	1.23	2.18	3.50	6.26	9.58	14.51	0.02
2133 (0.6 μ g/ml)	2.13	3.45	9.69	18.85	32.72	44.67	4.63
2135 (0.6 μ g/ml)	2.07	4.06	7.70	12.63	21.90	34.58	1.92
2139 (0.6 μ g/ml)	2.94	5.15	9.63	15.15	24.90	38.71	2.83
2117 (0.6 μ g/ml)	1.21	2.32	4.08	7.61	10.09	16.27	0.05
2137 (0.6 μ g/ml)	1.66	2.79	4.43	7.92	10.64	16.91	0.06
2006 (0.6 μ g/ml)	1.92	3.38	5.06	11.57	16.82	25.30	0.65
2006 (0.6 μ g/ml)	0.91	2.19	4.52	7.39	13.86	21.57	0.28
2006 (0.6 μ g/ml)	1.92	3.59	7.67	12.51	18.99	28.03	1.04
2395 (0.6 μ g/ml)	2.88	7.20	10.80	23.96	37.97	54.38	7.02
2396 (0.6 μ g/ml)	0.92	2.18	4.07	5.78	10.18	14.95	0.03
2397 (0.6 μ g/ml)	3.05	5.24	10.51	17.50	33.51	46.50	4.92
2398 (0.6 μ g/ml)	1.37	2.82	5.16	8.48	15.72	21.72	0.3
2012 (0.6 μ g/ml)	0.88	1.71	4.41	7.07	10.97	16.47	0.06
2102 (0.6 μ g/ml)	2.36	5.82	10.59	17.88	30.96	39.79	3.81
2103 (0.6 μ g/ml)	2.12	4.32	8.83	13.49	25.23	35.47	2.37
2013 (0.6 μ g/ml)	1.11	2.42	4.42	6.01	9.15	13.44	0.01
2142 (0.6 μ g/ml)	0.94	1.55	4.38	7.44	11.45	16.84	0.08
2180 (0.6 μ g/ml)	2.06	4.08	6.91	11.54	16.82	25.76	0.67
2007 (0.6 μ g/ml)	1.83	3.30	6.68	12.34	20.74	29.10	1.25
2136 (0.6 μ g/ml)							0.01

[0197] 표 2의 ODN 서열

[0198] 1585 GGGTCAACGTTGAGGGGGG (서열 35)

[0199] 2006 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 39)

- [0200] 2007 TCGTCGTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 46)
- [0201] 2013 TGTCGTTGTCGTTGTCGTTGTCGTT (서열 48)
- [0202] 2102 TCGTCGTTTTGACGTTTTGTCGTT (서열 49)
- [0203] 2103 TCGTCGTTTTGACGTTTTGACGTT (서열 50)
- [0204] 2117 TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT (서열 51)
- [0205] 2118 GGGGTCAAGCTTGAGGGGGG (서열 36)
- [0206] 2133 TCGTCGTTGGTTGTCGTTTTGGTT (서열 17)
- [0207] 2135 ACCATGGACGAGCTGTTCCCTC (서열 18)
- [0208] 2136 TCCTGACGTTCCGGCGCGCCC (서열 19)
- [0209] 2137 TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT (서열 20)
- [0210] 2139 TCGTCGTTTCGTCGTTTTGACGTT (서열 21)
- [0211] 2142 TCGCGTGCCTTTTGTGCTTTTACGTT (서열 22)
- [0212] 2180 TCGTCGTTTTTGTGCTTTTTTGTGCTT (서열 52)
- [0213] 2183 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (서열 53)
- [0214] 2186 TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTGTCC (서열 54)
- [0215] 2395 TCGTCGTTTTCGGCGCGCCG (서열 1)
- [0216] 2396 TCGTCGTTTTTGTGCTTTTTGTCGTT (서열 43)
- [0217] 2397 TCGTCGTTTTGTCGTTTTTGTGCTTT (서열 44)
- [0218] 2398 TTCGTGTTTTCGTGTTTTCGTCGT (서열 45)

[0219] 상기 데이터 및 다른 데이터에 기초하여 본 발명자들은 ODN 2395 서열이 현저히 강력한 NK 세포 및 IFN- α 생산 활성화제라는 결론을 내렸다.

[0220] 실시예 2: ODN 2395와 연관된 ODN 역시 NK 세포 및 IFN- α 생산의 강력한 활성화제이다.

[0221] ODN 2395의 3' 말단에 있는 팔린드롬이 이 서열의 면역자극 활성화에 중요할 수 있다는 가능성을 시험하기 위해 추가의 ODN 2427-2433 (서열 2-8)을 설계 및 합성하였다. 표 3은 NK L.U.를 활성화시키는 이들 여러가지 ODN의 능력을 비교하는 것이다. 이 데이터로부터 명백하게 드러나듯이, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 가장 강력한 ODN은 2.85 L.U.의 NK 활성을 유도한 ODN 2429 (TCGTCGTTTTCGGCGCGCCG, 서열 4)이다. ODN 2006은 이 실험에서 매우 약한 것으로 드러났으며, CG가 전혀 없는 대조군 ODN 2118 (GGGGTCAAGCTTGAGGGGGG, 서열 36)을 제외하고 시험된 다른 올리고머 모두가 2006보다 강력하였다. ODN 2429는 주목할만한데, 이는 이 ODN이 2395에 있던 것과 다른 팔린드롬이기는 하지만 12-염기 팔린드롬을 유지하고 있는 유일한 ODN이기 때문이다. 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 두 번째로 강력한 ODN인 ODN 2430 (TCGTCGTTTTCGGCGCGCCG, 서열 5)도 유사하지만, 팔린드롬이 10개 염기 길이로 약간 짧아졌다. 나머지 ODN은 팔린드롬 서열이 전혀 없거나 더 짧으며, 더 약한 NK 활성을 유도한다.

표 3

[0222] 각종 ODN과 함께 하룻밤 배양한 인간 PBL

ODN	E:T 비율						L.U.
	3.1	6.3	12.5	25.0	50.0	100.0	
단독	0.37	0.64	0.25	1.02	2.15	3.23	0.00
IL-2 (100 U/ml)	3.01	4.20	9.01	18.92	27.37	38.17	3.22
1585 (10 $\mu\text{g/ml}$)	1.35	2.30	4.38	8.07	13.96	22.31	0.31
2118 (10 $\mu\text{g/ml}$)	-0.31	-0.21	0.22	1.57	1.24	2.41	0.00
2395 (1 $\mu\text{g/ml}$)	1.01	2.61	5.73	11.39	18.92	28.16	1.04

2395 (3 $\mu\text{g/ml}$)	1.59	2.55	5.96	12.09	20.46	33.87	1.71
2006 (1 $\mu\text{g/ml}$)	-0.08	0.73	1.45	3.03	7.11	12.49	0.01
2006 (3 $\mu\text{g/ml}$)	0.16	0.76	2.98	4.98	9.79	20.58	0.15
2427 (1 $\mu\text{g/ml}$)	0.85	1.80	4.03	6.37	12.53	24.12	0.34
2427 (3 $\mu\text{g/ml}$)	0.96	2.24	4.40	8.00	15.01	21.85	0.33
2428 (1 $\mu\text{g/ml}$)	1.19	1.97	3.64	7.72	16.27	24.74	0.53
2428 (3 $\mu\text{g/ml}$)	1.42	2.36	5.67	11.06	19.11	28.17	1.03
2429 (1 $\mu\text{g/ml}$)	1.47	3.84	7.83	14.17	25.47	38.99	2.85
2429 (3 $\mu\text{g/ml}$)	0.57	2.38	4.21	8.98	16.88	26.36	0.72
2430 (1 $\mu\text{g/ml}$)	1.49	3.55	6.25	12.76	20.51	31.67	1.51
2430 (3 $\mu\text{g/ml}$)	1.23	1.52	3.89	8.78	15.28	25.56	0.57
2431 (1 $\mu\text{g/ml}$)	0.96	2.90	3.58	8.29	15.23	25.29	0.53
2431 (3 $\mu\text{g/ml}$)	1.82	3.25	5.53	9.67	21.04	32.78	1.51
2432 (1 $\mu\text{g/ml}$)	1.67	2.97	4.87	8.54	19.26	27.10	0.84
2432 (3 $\mu\text{g/ml}$)	1.03	2.39	5.22	9.41	18.48	25.74	0.76
2433 (1 $\mu\text{g/ml}$)	0.74	1.84	2.30	6.97	12.43	18.94	0.15
2433 (3 $\mu\text{g/ml}$)	1.25	3.13	4.47	9.85	14.77	22.75	0.38

[0223] 표 3의 ODN 서열

[0224] 1585 GGGGTCAACGTTGAGGGGGG (서열 35)

[0225] 2006 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 39)

[0226] 2118 GGGGTCAAGCTTGAGGGGGG (서열 36)

[0227] 2395 TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (서열 1)

[0228] 2427 TCGTCGTTTTTCGTCGCGCCG (서열 2)

[0229] 2428 TCGTCGTTTTTCGTCGCGGCG (서열 3)

[0230] 2429 TCGTCGTTTTTCGGCGGCCGCG (서열 4)

[0231] 2430 TCGTCGTTTTTCGGCGCGCCG (서열 5)

[0232] 2431 TCGTCGTTTTTCGGCGCCGCG (서열 6)

[0233] 2432 TCGTCGTTTTTCGCCCGCGCG (서열 7)

[0234] 2433 TCGTCGTTTTCCGCCCGGGG (서열 8)

[0235] 도 4는 양성 대조군 SOS인 ODN 2216 (GGGGACGATCGTCGGGGG, 서열 55), 2334 (GGGGTCGACGTCGACGTCGAGGGGGG, 서열 56), 및 2336 (GGGGACGACGTCGTGGGGGG, 서열 57)와 대비하여 IFN- α 생산을 유도하는 이들 올리고머의 능력을 보여준다. 2395-연관된 ODN은 모두 키메라 SOS ODN에 의해 유도된 수준보다는 낮지만 ODN 2006보다는 높은 수준의 IFN- α 생산을 유도한다. IFN- α 발현 유도의 순위는 NK L.U.에 대한 것과 대충 비슷하며, 가장 강력한 효과는 ODN 2395 및 2429의 경우에 관찰된다.

[0236] 실시예 3: NK 세포 및 IFN- α 생산에 대한 강력한 자극 효과가 B-세포 효과에 대응하지 않는다.

[0237] 도 5A에 도시된 바와 같이, ODN 2395 및 그 연관 뉴클레오티드는 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 48 시간 시점에 CD86의 B 세포 발현을 유도하는 능력에 있어서 ODN 2006 또는 그에 연관된 2397보다 상당히 약했다. 본 발명자들이 앞서 알아차린 바와 같이, 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 같이 더 높은 ODN 농도에서는 여러가지 ODN 사이에 차이가 적게 나타났다 (도 5B). 동일한 실험에서, 본 발명자들은 증식 분석법 (^3H -티미딘 흡수; 도 6)으로 B-세포 활성화를 측정하기도 하였다. 여기서도, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 ODN 2006과 ODN 2397 (서열 44)이 현격한 차이로 가장 강력했다 (도 6A). 그러나, 더 높은 농도에서는 2395-연관된 ODN들은 효능에 있어 비슷했다. (도 6B).

[0238] 실시예 4: ODN 2395 및 연관된 ODN은 약한 IL-10 유도인자이다.

[0239] 본 발명자들의 이전 연구결과는 CpG에 의해 유도되는 IL-10 생산의 대부분이 B 세포에서 유래된다는 것을 시사하였다. 도 7에 나타나는 바와 같이, IL-10 발현은 B-세포 증식과 양호한 상관관계를 보였다. 역시, ODN 2006 및 그에 연관된 ODN 2397는 0.25 µg/ml의 저농도에서 가장 강력하였다. ODN 2395 및 그에 연관된 ODN은 이 농도에서는 IL-10 생산을 덜 유도하였다.

[0240] 실시예 5: 면역자극 효과의 농도 의존성

[0241] 이 부류의 올리고뉴클레오티드 및 그 유도체에 대한 추가의 연구에는 ODN 번호 2427-2433 (서열 2 내지 8)이 관련된다. 이들 ODN에 대한 데이터를 도 8에 나타내었다. 이 데이터는 ODN 2006이 1 또는 6 µg/ml 농도에서 IFN-α 생산을 유도하는 데 매우 약했다는 것을 다시 보여준다. 그러나 ODN 2395는 상당한 양의 IFN-α를, 특히 1 µg/ml의 낮은 농도에서 유도하였다. 본 발명자들은 1 µg/ml과 같은 낮은 농도에서 나타나는 효과에 비해 높은 농도, 예컨대 6 µg/ml에서 자극 활성이 저하되는 ODN을 종종 보았다. 도 8에 나타낸 실험에서, ODN 2395는 높은 농도에서보다 낮은 농도에서 더 강력하였으나 ODN 2429는 높은 농도에서 더 강력하였다. 포스포포티오에이트 ODN의 보편적인 역전 용량-반응 곡선과 대조적으로 이 실험의 ODN 2336과 같은 키메라 ODN은 대개 높은 농도에서 높아진 면역자극 효과를 보였다. 도 8에 나타낸 이 실험의 ODN 2432의 자극 효과는 이 ODN이 양호한 팔린드롬을 갖지 않는다는 것을 고려하면 흥미롭다. 비교적 약한 B 세포 자극 활성을 갖는 이 계를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0242] 실시예 6: B-세포 자극 및 NK 자극과 IFN-α 분비 사이의 역비례 관계

[0243] 도 9는 0.4 µg/ml의 낮은 농도에서 ODN 2395가 CD86의 B 세포 발현을 유도하는 데 ODN 2006보다 상당히 약하게 나타나는 또다른 실험을 보여준다. 2395의 나머지 연관 ODN은 덜 현저한 B 세포 자극 소실을 보인다. 흥미롭게도, B 세포 자극의 소실에 대해 앞서 NK 자극의 증가에서 본 것과 동일한 순위가 성립한다는 시사를 받게 된다: 즉 ODN 2429, 그 뒤를 이어 ODN 2430이 2395 연관 ODN 중 가장 약한 B 세포 자극인자이다. 이로부터, 2395-유사 ODN에 의한 B 세포 자극의 소실이 NK 자극 및 IFN-α 분비의 증가에 밀접하게 관련될 가능성이 제기된다. 도 10 및 도 11은 IFN-α 유도가 ODN 2395 및 ODN 2429, 그 뒤를 이어 ODN 2430에서 관찰됨을 보여준다. 별도의 실험에서 얻어진 표 4 및 도 12 역시 두 명의 상이한 인간 공여체 (D141 및 D142)의 경우에 IFN-α 분비를 유도하는 ODN 2395 및 ODN 2429의 강한 능력을 보여준다.

표 4

[0244] ODN 2395의 변이체에 의한 IFN-α 분비¹

ODN, 6 µg/ml	IFN-α, pg/ml	
	D141	D142
2006	10 ±10	7 ±0.5
2336	83,297 ±1876.5	53530.5 ±4840
2395	6214 ±84.5	2031 ±96
2429	7215 ±68	1117.5 ±495
5293	10 ±0.5	27 ±27
5294	2.5 ±0.1	23 ±23
5295	5 ±0.5	0 ±0
5296	10 ±0	10 ±0
5297	10 ±0.5	26.5 ±1
부재 (w/o)	110 ±77.5	12 ±12

¹ 데이터는 pg/ml 단위로, 평균 ±표준 편차 형태로 나타냄

[0245] 표 4의 ODN 서열

[0246] 2006 TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (서열 39)

[0247] 2336 GGGGACGACGTCGTGGGGGGG (서열 57)

- [0248] 2395 TCGTCGTTTTTCGGCGCCGCCG (서열 1)
- [0249] 2429 TCGTCGTTTTTCGGCGCCGCCG (서열 4)
- [0250] 5293 TCGTCGTTTTTCGGCGCCGCCG (서열 58)
- [0251] 5294 TCGTCGTTTTTCGGCGCCGCCG (서열 59)
- [0252] 5295 TCGTCGTTTTTCGGCGCCGCCG (서열 60)
- [0253] 5296 TCGTCGTTTTTCGGCGCCGCCG (서열 61)
- [0254] 5297 TGCTGCTTTTTTCGGCGCCGCCG (서열 62)
- [0255] 실시예 7: GC-풍부 도메인의 특성
- [0256] 놀랍게도, ODN 5293-5297 중 어떤 것도 강한 면역자극성 반응을 보이지 않았다. ODN 5293은 10-염기 팔린드롬을 포함하지만, 이 팔린드롬은 중앙의 CG가 GC로 역전되었다는 점에서 2395에 있는 것과는 다르다. 그러나, ODN 2429 역시 그러한 역전을 갖고 있으므로 이 변화 자체가 활성의 소실을 설명해주지는 못한다고 여겨진다. 오히려, 팔린드롬에 중앙의 CG가 있지 않는 한 12-염기 팔린드롬에서 더 높은 수준의 활성이 일어날 수도 있다. 그러나 ODN 2430 역시 중앙에 GC 디뉴클레오티드가 있는 10-염기 팔린드롬만을 가지고 있다. ODN 2430의 면역자극 활성은, ODN 5293이 3' 말단에 CpG 디뉴클레오티드를 단지 3개 포함하고 있는데 반해 이 ODN은 3' 말단에 5개의 CpG 디뉴클레오티드를 포함하고 있다는 사실에 의해 증강될 수 있다.
- [0257] ODN 5294는 단지 6-염기로 된 팔린드롬을 포함하고 있으며, 이것이 이 ODN의 낮은 활성에 관련되어 있을 가능성이 있다. ODN 5295도 마찬가지로 양호한 팔린드롬을 포함하지 않고 있다. ODN 5296의 낮은 활성은 CCG의 단순한 반복이 ODN 2395의 면역자극 효과를 부여하는 데 충분하지 않다는 것을 시사한다. ODN 2397은 3' 말단에 완벽한 12-염기 팔린드롬을 가지고 있으나 5' 말단에는 CpG 모티프를 전혀 갖고 있지 않다. ODN 5297에 있는 12-염기 팔린드롬은 ODN 2429에 있는 것과 동일하므로 ODN 2429의 5' TCGTCG 모티프가 해당 ODN의 면역자극 활성에 중요하다는 결론을 내릴 수 있다. 즉, 올리고뉴클레오티드의 한쪽 말단에 있는 ODN 2429의 중화 팔린드롬의 존재가 다른 쪽 말단에 하나 이상의 자극 모티프가 존재하지 않을 때에는 면역자극 활성을 제공하기에 부족할 것으로 보인다.
- [0258] 실시예 8: IFN- γ 생산에 대한 효과
- [0259] 이 새로운 부류의 면역자극성 핵산의 면역자극 효과의 범위를 더 잘 이해하기 위해 몇 가지 추가적인 유형의 분석을 수행하였다. 도 13은 인간 PBMC의 상청액에서 이들 ODN의 IFN- γ 생산에 대한 효과의 일부를 보여준다. 이들 세포는 표 3에 나타낸 실험에 사용된 것과 동일하였으나 배양물의 상청액에서 IFN- γ 수준을 분석하였다. 도 13의 패널 C는 ODN 1585와 같은 SOS CpG ODN이 약간의 IFN- γ 생산을 유도하는 반면 CpG 모티프가 없는 ODN (예, 대조군 ODN 2118)은 그렇지 않음을 보여준다. 도 13의 패널 A 및 B는 ODN 2006이 IFN- γ 생산을 유도하는 데 비교적 약한 반면 ODN 2395 및 그에 연관된 ODN은 좀더 강하다는 것을 보여준다.
- [0260] 상기 여러가지 ODN의 수치상 세포에 대한 효과를 검사하기 위해 또다른 일련의 조사를 수행하였다. 형질세포양 DC (pDC)는 ODN 2395 및 그 연관 ODN에 반응하여 생산되는 IFN- α 의 공급원이다. 여러가지 ODN의 골수성 DC (mDC)에 대한 효과는, ODN 모두가 부분 정제된 mDC가 CD4+ T 세포를 활성화시켜 IFN- α 를 생산하도록 유도한다는 점에서 비교적 비슷하다 (도 14 및 도 15). 골수성 DC는 연층에서 단리하여 GM-CSF (4.4 ng/ml) 및 각종 ODN과 2 일 동안 배양하였다. 그 다음 CD4+ 미시핵 T 세포를 다른 공여체에게서 단리하고 선택된 이펙터 대 표적 (E:T) 비율로 DC와 혼합한 다음 6 일 더 배양하였다. 그 다음 형광 활성화 세포 분류법 (FACS)으로 세포를 염색하고 분석하였다. 그 결과를 IFN- γ 에 대해 염색된 CD3+ 세포의 백분율로 측정하였다. 도 14는 IFN- γ 에 대해 양성으로 염색된 T 세포의 백분율을 보여주며, 도 15는 이들 T 세포에서 IFN- γ 염색의 평균 형광 강도 (MFI)를 보여준다.
- [0261] 실시예 9: 모든 GC-풍부 팔린드롬이 효과적인 것은 아니다.
- [0262] 이 새로운 부류의 ODN에 대한 구조적 요건을 더 잘 이해하기 위해 몇 가지 추가의 ODN을 합성하였다. 본 발명자들은 강력한 면역자극성 ODN이 GC-풍부 팔린드롬을 포함하고 있다는 것에 주목했으므로, 단순히 연속적인 G의 뒤에 연속적인 C가 오거나, 연속적인 C의 뒤에 연속적인 G가 오는 GC-풍부 팔린드롬을 갖도록 ODN 2449 (TCGTCGTTTTTCGGGGGGCCCC, 서열 9) 및 2450 (TCGTCGTTTTCCCCGGGGGG, 서열 10)를 합성하였다. 도 16에 나타

낸 바와 같이, 이들 ODN 중 어느 것도 IFN- α 생산을 유도하지 못했다.

[0263] 실시예 10: 면역자극성 서열 및 중화 모티프의 배향의 영향

[0264] "자극성" TCGTCG 모티프와 "중화" CGGCGCGCGCCG (서열 23) 팔린드롬의 5' 및 3' 배향을 면역자극 활성을 잃지 않으면서 역전시킬 수 있는 가능성을 시험하기 위해 ODN 2451 (TCGGCGCGCGCCGTCGTCGTTT, 서열 11)을 합성하였다. 실제로, ODN 2451은 고도로 자극성이었다 (도 16). 자극성 TCGTCG 모티프가 5' 말단에 있다고 할 때, 면역자극 활성을 감소시키기 않으면서 CGGCGCGCGCCG (서열 23) 팔린드롬의 3' 말단에 추가의 서열을 부가할 수 있는지를 알아보기 위해 ODN 2452 (TCGTCGTTTTTCGGCGCGCGCCGTTTTT, 서열 12)를 합성하였다. 실제로, 이 ODN 역시 고도로 면역자극성이었다 (도 16).

[0265] 실시예 11: ODN 2395의 변이체 및 그들의 IFN- α 유도

[0266] 본 발명의 새로운 부류의 ODN이 IFN- α 분비를 유도하기 위한 구조적 요건을 더 상세히 조사하기 위해 ODN 2395의 변이체를 합성하여 면역자극 활성을 시험하였다. 표 5는 IFN- α 유도에 대한 데이터를 요약한 것이다.

표 5

[0267] ODN 2395의 변이체 및 그들의 IFN- α 유도^{1, 2}

ODN	서열	서열	팔린드롬	설명	IFN- α 유도
2006	39	tcgtcgTTTTgtcgTTTTgtcgTT	/	ODN 클래스 B	-
2336	57	ggGGACGACGTCCTGgggggG	+	ODN 클래스 A	++++
2395	1	tcgtcgTTTTcggcgcgcgccg	+	2006 - 2136	++
2427	2	tcgtcgTTTTcgtcgcgcgccg	-		-
2428	3	tcgtcgTTTTcgtcgcgcggcg	-		-
2429	4	tcgtcgTTTTcggcggcgccg	+	팔린드롬 보존에 의해 cg→gc	+++
2430	5	tcgtcgTTTTcggcgcgcgcgcg	-		+
2431	6	tcgtcgTTTTcggcgcgcgcgcg	-		+/-
2432	7	tcgtcgTTTTcgccccgcgcgg	-		+
2433	8	tcgtcgTTTTccgcgcgcgggg	-		-
5293	58	tcgtcgTTTTcggcggcgcc	(+)	2429 w/o 3'g	-
5294	59	tcgtcgTTTTcgcccgccg	-	3xgcc w/o 3'g	-
5295	60	tcgtcgTTTTcggcgcgcgccg	-	5295 w/3'g	-
5296	61	tcgtcgTTTTcgcccgccg	-		-
5297	62	tgctgTTTTcggcggcgccg	+	2429의 gc	-
5327	14	tgctzgtTTTTzggzgzgzgzzg	+	2395 w/메틸-c (z)	+
5328	15	tgctgTTTTcggcgcgcgccg	+	2395의 gc	-
2136	19	tcctgacgttcggcgcgcgcc	(+)		+/-
5315	13	tcctgacgttcggcgcgcgccg	+	2136 w/3'g 더 긴 팔린드롬	+?
5329	16	tcgtcgTTTTcggcgcgcgcgcg	+	2006 + 1631	(-)

¹ 2395와 다른 뉴클레오티드에는 밑줄, 팔린드롬 서열은 이탤릭체로 표시

² 키메라 골격 ODN (대문자는 포스포디에스테르 연결기를 나타내고 소문자는 포스포로티오에이트 연결기를 나타냄)을 대표하는 ODN 2336을 제외하고는 모두 완전히 포스포로티오에이트 ODN임

[0268] 포스포로티오에이트 ODN인 2395 및 2427-2433을 사용한 첫 번째 일련의 실험으로부터, 비록 3' 말단에 그러한 팔린드롬이 없는 몇몇 ODN (예, ODN 2430 및 ODN 2432) 역시 IFN- α 를 약간 더 소량으로 유도하기는 했으나 (도 17A에 예시), 이 ODN의 3' 말단에 있는 팔린드롬 서열이 IFN- α 의 주생산자인 수지상 세포에 의한 IFN- α 분비의 유도에 중요한 역할을 한다는 것이 명백해졌다 (2395 및 2429 참조). ODN 2395과 ODN 2429가 최고량의 IFN- α 를 유도한 반면 2006 (클래스 B ODN)은 전혀 유도하지 못하거나 최소량으로 유도하였으며, ODN 2336 (클래스 A ODN)은 이 사이토카인을 다량으로 유도하였다. 대부분의 실험에서 ODN 2429가 이 사이토카인을 더욱더 많은 양으로 유도한다는 것으로 밝혀졌다 (도 17B). 추가의 TCG 모티프를 도입하는 것 (예, ODN 2427 및 ODN 2428)은

IFN- α 분비에 부정적인 효과를 가져오는 것으로 나타났다. 이들 실험과 ODN 2186에 대한 다른 조사에서 얻은 데이터를 토대로 하면, 3' 말단에 있는 gcc가 관찰된 효과에서 모종의 역할을 할 가능성이 있다고 보였다.

- [0269] 그에 따라서 본 발명자들은 모두가 3' 말단에 GCC 서열을 갖는 또다른 일련의 ODN을 시험하였다. 이들 ODN 중 어느 것도 IFN- α 를 유도하는 것으로 관찰되지 않았다. 그러므로 팔린드롬 내에 있는 GCC 자체만으로는 관찰된 효과를 가져오는 데 충분한 것으로 보이지 않는다.
- [0270] 또한, 5' 말단에 TGC가 있는 ODN 5297은 팔린드롬 3' 서열을 보유하고 있음에도 불구하고 IFN- α 를 전혀 유도하지 않았다. 이로부터 3' 팔린드롬 서열뿐 아니라 5' TCG 모티프 역시 이들 ODN의 활성화에 중요하다는 결론이 내려졌다.
- [0271] 이것은 ODN 5328 (5' TGC 모티프가 있는 2395)을 사용하여 확인하였다. 클래스 A ODN의 메틸화와는 대조적으로, 적어도 5' 모티프의 메틸화는 IFN- α 분비를 감소시키기는 하였으나 중단시키지는 않았다. 이러한 사실은 클래스 B ODN에서 얻어진 결과와 합치된다. 그럼에도 불구하고, 3' 팔린드롬의 일부를 보유하나 5' 말단에 단지 하나의 CpG 디뉴클레오티드가 있는 상이한 서열을 갖는 ODN (ODN 2136) 역시 IFN- α 를 유도하였다. 이 ODN과 완전한 3' 팔린드롬을 갖는 ODN (ODN 5315)을 사용하여 얻은 예비적인 결과에서, ODN 5315은 ODN 2136보다 나왔으나 ODN 2395만큼 좋지는 않았다.
- [0272] ODN 5329가 3' 말단에 완전한 CG 팔린드롬을 가짐에도 불구하고 IFN- α 를 전혀 유도하지 않거나 아주 소량만을 유도하는 것으로 보인다는 사실은 IFN- α 활성을 위해서는 특수한 팔린드롬 서열이 바람직하다는 것을 지시한다.
- [0273] 실시예 12: B-세포 활성화와 IFN- α 유도 사이의 역비례 관계
- [0274] 실시예 11의 ODN의 일부로 된 패널을 사용하여 추가의 B-세포 활성화 실험을 행하였다 (도 18). 그 결과는 어떤 ODN이 IFN- α 유도에 좋을수록 그 ODN은 B 세포에 대해서는 활성이 낮음을 보여주었다 (특히 ODN 2006, 2336, 2395 및 2429를 비교). 그럼에도 불구하고, 이들 ODN 모두가 B 세포 자극에 있어서 2336 (클래스 A ODN)보다 우수하다는 것도 밝혀졌다.
- [0275] 실시예 13: IFN- γ 분비에 대한 효과
- [0276] 본 발명자들은 또한 PBMC를 여러가지 농도의 ODN과 함께 배양했을 때 여러 시점에서 IFN- γ 의 분비를 측정하였다 (도 19 A-C). 시험된 ODN은 2336 > 2395, 2429 > 2006의 순위로 IFN- γ 분비를 유도하였다. 그러나 ODN들 간의 차이는 IFN- α 를 표시자로 사용한 경우만큼 뚜렷하지 않았다.
- [0277] 실시예 14: MLR 중 IFN- γ 에 대한 효과
- [0278] 본 발명자들은 또한 혼합 림프구 반응물 (MLR) 중에서 IFN- γ 의 유도에 대한 이들 ODN의 효과를 측정하였다. 이 설정에서는 한 공여체의 림프구가 다른 공여체의 세포 상에 발현된 항원에 대해 반응한다. 그 결과는 ODN 2006, 2336과 2395가 그러한 항원 특이적 반응 과정에서 IFN- γ 분비를 증강시킬 수 있음을 보여주었다 (도 20). 이것은 이들 ODN 모두가 특이적 항원에 대한 반응성을 증강시킬 수 있음을 지시한다.
- [0279] 실시예 15: ODN 2395는 ODN 2006보다 IL-10을 약하게 유도한다.
- [0280] 또다른 일련의 실험에서는 염증성 사이토카인인 IL-10의 유도에 초점을 맞추었다. 여기서도, 앞서의 IFN- γ 에 대해서와 마찬가지로, PBMC를 상이한 시간 동안 서로 다른 농도의 ODN과 함께 배양하였다 (도 21 A-C). 그 결과는, 앞서 밝혀진 바와 같이, 최소치 내지 소량만을 유도하는 ODN 2336과는 대조적으로 ODN 2006이 비교적 다량의 IL-10을 유도한다는 것이다. 이와 대조적으로, ODN 2395 및 ODN 2429는 ODN 2336보다는 많지만 ODN 2006보다는 적은 IL-10을 유도한다. 이것 역시 본 발명의 새로운 부류의 면역자극성 ODN에 속하는 ODN이 이들 ODN을 클래스 A 및 클래스 B의 ODN에 대해 알려진 것들의 중간에 위치하게 하는 자극 활성을 가진다는 것을 확인시켜준다.
- [0281] 실시예 16: ODN 2395는 ODN 2006보다는 적지만 ODN 8954보다는 많은 TNF- α 를 유도한다.
- [0282] 인간 PBMC를 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2006, 8954, 2395, 2429, 또는 LPS와 함께 6 시간 동안 배양한 다음 상청액을 수거하고 특이적 ELISA로 TNF- α 를 측정하였다. 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

[0283] 상이한 클래스의 대표적인 ODN에 의한 TNF- α 의 유도

ODN	TNF- α , pg/ml
(LPS)	>120
2006	40
2429	35
2395	21
8954	14
없음	16

[0284] 추가의 실험에서 사이토카인 IL-5 및 IL-15는 상기 ODN과 PBMC의 배양시 본 발명자들이 사용한 실험 조건에서는 검출될 수 없다는 것을 알게 되었다.

[0285] 실시예 17; IP-10의 유도

[0286] 인간 PBMC를 단독으로, 또는 IL-2의 존재하, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 대조군 ODN 1585 또는 대조군 ODN 2118 존재하, 또는 0.6 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 여러가지 ODN의 존재하에서 배양하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 효소-연결 면역흡착 분석법 (ELISA)으로 IP-10을 측정하였다. 그 결과를 도 22에 나타내었다. 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2395, 2429, 2430, 2432, 및 2451, 그리고 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2452 모두 다량의 IP-10을 유도하였다.

[0287] 실시예 18: IFN- α 의 유도

[0288] 인간 PBMC를 단독으로, 또는 IL-2의 존재하, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 대조군 ODN 1585 또는 대조군 ODN 2118 존재하, 또는 0.6 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 여러가지 ODN의 존재하에서 배양하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 ELISA로 IFN- α 를 측정하였다. 그 결과를 도 23A (ODN 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 도 23B (ODN 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 나타내었다. 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2395, 2427, 2429, 2430, 2431, 2432, 및 2451, 그리고 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2452 모두 다량의 IFN- α 를 유도하였다.

[0289] 실시예 19: IFN- γ 의 유도

[0290] 인간 PBMC를 단독으로, 또는 IL-2의 존재하, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 대조군 ODN 1585 또는 대조군 ODN 2118 존재하, 또는 0.6 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 여러가지 ODN의 존재하에서 배양하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 ELISA로 IFN- γ 를 측정하였다. 그 결과를 도 24에 나타내었다. 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2395, 2427, 2429, 2430, 2431, 2432, 2451 및 2452, 그리고 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2352 모두 다량의 IFN- γ 를 유도하였다.

[0291] 실시예 20: IL-6의 유도

[0292] 인간 PBMC를 단독으로, 또는 IL-2의 존재하, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 대조군 ODN 1585 또는 대조군 ODN 2118 존재하, 또는 0.6 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 여러가지 ODN의 존재하에서 배양하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 ELISA로 IL-6를 측정하였다. 그 결과를 도 25에 나타내었다. 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2395, 2430, 2432, 2433, 2136, 2449, 2450, 2451 및 2452, 그리고 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2449 모두 다량의 IL-6를 유도하였다.

[0293] 실시예 21: IFN- α 의 유도

[0294] 인간 PBMC를 단독으로, 또는 3.0 또는 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 여러가지 ODN의 존재하에서 배양하였다. ODN는 2006, 8954, 2395, 2449, 2450, 2451, 2452, 5373 (CGGCGCGGCCG, 서열 23), 5374 (CGGCGCGGCCGCGCGCGGCCG, 서열 24), 5375 (CGGCGCGGCCGTCGTCGTTT, 서열 25), 5376 (TCGCGCGCGCCGTGCTGCTTT, 서열 26), 및 5377 (CCGCCGTTTTCGGCGCGGCCG, 서열 27)을 포함하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 ELISA로 IFN- α 를 측정하였다. 그 결과를 도 26에 나타내었다. ODN 2395, 2451, 2452, 및 5376 모두 IFN- α 를 유도하였다.

[0295] 실시예 22: ODN 5515 및 ODN 5516에 의한 IFN- α 의 유도

[0296] 두 명의 공여체 (D346 및 D240)에게서 얻은 인간 PBMC를 단독으로, 또는 0.8, 2.4, 또는 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2006, ODN 5515, 또는 ODN 5516의 존재하에 배양하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 ELISA로 IFN- α 를 측정하였다. 그 결과를 표 7에 나타내었다. ODN 5515 및 ODN 5516은 ODN 2006보다 더 효과적으로 IFN- α 를 유도하며, 특히 ODN 농도 2.4 및 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 그러하다.

[0297] 실시예 23: ODN 20184, 20185, 및 20186에 의한 IFN- α 의 유도

[0298] 세 명의 공여체 (D445, D446, 및 D448)에게서 얻은 인간 PBMC를 단독으로, 또는 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 또는 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 ODN 2006, ODN 20184, ODN 20185, 또는 ODN 20186의 존재하에 배양하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 ELISA로 IFN- α 를 측정하였다. 그 결과를 표 8에 나타내었다. ODN 20184, ODN 20185, 및 ODN 20186은 ODN 2006보다 더 효과적으로 IFN- α 를 유도하며, 특히 0.2-0.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유도하였다.

표 7

[0299] ODN 5515 및 ODN 5516에 의한 IFN- α 의 유도 (pg/ml)

ODN	농도 $\mu\text{g/ml}$	D346 평균 \pm 표준편차	D240 평균 \pm 표준편차
2006	0.8	18.5 \pm 13.8	36 \pm 3.3
	2.4	0 \pm 0	19.7 \pm 6.4
	6	2.7 \pm 0	2.8 \pm 0
5515	0.8	34.1 \pm 6.9	16.5 \pm 2.8
	2.4	36.6 \pm 2.1	106.7 \pm 17.3
	6	39.2 \pm 26.5	127.3 \pm 7.7
5516	0.8	4.3 \pm 0	22.3 \pm 0.1
	2.4	31.9 \pm 0	172.5 \pm 82.3
	6	26.6 \pm 19	90.4 \pm 15.4
없음	--	0 \pm 0	20.9 \pm 6.5

표 8

[0300] ODN 20184, 20185, 및 20186에 의한 IFN- α 의 유도 (pg/ml)

ODN	농도 $\mu\text{g/ml}$	D445 평균 \pm 표준편차	D446 평균 \pm 표준편차	D448 평균 \pm 표준편차
2006	0.05	5.2 \pm 0.0	58.8 \pm 1.9	0.9 \pm 0.0
	0.1	27.7 \pm 14.4	283.5 \pm 16.1	23.5 \pm 3.8
	0.2	54.9 \pm 17.6	503.7 \pm 9.7	39.1 \pm 5.0
	0.5	61.1 \pm 14.6	227.8 \pm 12.7	49.8 \pm 0.4
	1.0	26.4 \pm 15.5	142.6 \pm 23.1	48.7 \pm 29.8
20184	0.05	25.6 \pm 2.1	88.0 \pm 12.2	0.0 \pm 0.0
	0.1	32.9 \pm 7.3	691.2 \pm 32.3	129.1 \pm 24.8
	0.2	256.2 \pm 8.2	2155.1 \pm 35.1	314.0 \pm 22.2
	0.5	757.2 \pm 5.7	2171.8 \pm 95.9	268.7 \pm 15.9
20185	1.0	194.3 \pm 5.7	1181.9 \pm 15.1	5.8 \pm 3.4
	0.05	65.0 \pm 10.8	217.9 \pm 28.4	54.3 \pm 14.2
	0.1	63.6 \pm 1.3	467.4 \pm 23.7	150.9 \pm 5.9
	0.2	79.3 \pm 2.4	1420.5 \pm 83.7	160.2 \pm 5.5
	0.5	281.3 \pm 0.2	1965.7 \pm 72.3	162.4 \pm 3.8
20186	1.0	176.9 \pm 12.5	1710.3 \pm 19.7	181.1 \pm 0.1
	0.05	21.9 \pm 1.7	223.1 \pm 1.2	79.8 \pm 1.6
	0.1	58.3 \pm 7.6	812.2 \pm 28.1	111.3 \pm 6.8
	0.2	153.6 \pm 1.5	1302.5 \pm 56.2	193.5 \pm 10.5
	0.5	267.7 \pm 7.9	1744.1 \pm 54.7	227.4 \pm 6.9
매질	--	0.0 \pm 0.0	12.8 \pm 2.0	64.8 \pm 32.7
	--	0.0 \pm 0.0	45.3 \pm 12.9	36.4 \pm 2.6

[0301] 실시예 24: ODN 8954, 5569, 및 5570에 의한 IFN- α 의 유도

[0302] 세 명의 공여체 (D521, D525, 및 D526)에게서 얻은 인간 PBMC를 단독으로, 또는 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ODN 2006 (서열 39), ODN 8954, ODN 5569 (TIGTIGTTTTCGGCGGCCGCCG 서열 63), 또는 ODN 5570 (TCITCITTTTTCGGCGGCCGCCG 서열 70)의 존재하에 배양하였다. 24 시간 후 상청액을 수거하고, 특이적 ELISA로 IFN- α 와 IL-10을 측정하였다. 그 결과를 표 9 및 10에 나타내었다.

표 9

[0303] ODN 8954, 5569, 및 5570에 의한 IFN- α 의 유도 (pg/ml)

ODN	농도 $\mu\text{g}/\text{ml}$	D521 평균 \pm 표준편차	D525 평균 \pm 표준편차	D526 평균 \pm 표준편차
2006	0.03	238.674	239.286	216.393
	0.06	2405.63	385.161	126.516
	0.125	3826.53	549.612	86.173
	0.25	2248.94	532.67	74.493
	1.0	362.74	161.892	57.087
8954	0.03	305.626	309.581	599.971
	0.06	6039.51	2028.52	4707.01
	0.125	7322.45	4669.31	5340.21
	0.25	7651.13	4641.1	5324.55
	1.0	7078.59	4679.59	5474.94
5569	0.03	112.784	121.422	87.751
	0.06	110.723	65.753	47.888
	0.125	104.547	49.365	41.046
	0.25	111.755	62.383	43.216
	1.0	2247.97	115.77	1101.58
5570	0.03	822.648	427.535	250.196
	0.06	1858.16	1021.18	218.201
	0.125	3470.67	1657.3	477.938
	0.25	5612.53	3369.99	669.706
	1.0	6798.3	3501.59	2560.93
매질	--	145.436	214.212	66.853
	--	245.121	218.622	0

표 10

[0304] ODN 8954, 10101-2, 5569, 및 5570에 의한 IL-10의 유도 (pg/ml)

ODN	농도 $\mu\text{g}/\text{ml}$	D521 평균 \pm 표준편차	D525 평균 \pm 표준편차	D526 평균 \pm 표준편차
2006	0.03	151.976	112.414	485.823
	0.06	384.377	218.651	898.299
	0.125	404.352	242.289	991.614
	0.25	357.657	247.405	1150.94
	1.0	255.344	162.444	1171.72
8954	0.03	7.456	6.617	6.919
	0.06	5.34	5.721	19.787
	0.125	10.723	2.986	35.892
	0.25	15.308	13.056	67.18
	1.0	48.904	30.892	230.725
5569	0.03	0	1.287	1.348
	0.06	0	0.127	4.592
	0.125	18.815	3.615	62.963
	0.25	105.32	30.094	350.529
	1.0	256.785	136.833	1156.07

5570	0.03	0	0.31	5.867
	0.06	6.599	7.027	29.879
	0.125	98.553	38.528	455.145
	0.25	259.812	107.164	1169.46
	1.0	312.189	206.126	1595.63
매질	--	1.755	10.543	0
	--	0.29	11.192	0

[0305] 상기 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있게 하기에 충분하다고 여겨진다. 실시예는 본 발명의 일 측면의 단일 예시로 의도된 것이며 다른 기능상 균등한 실시태양들이 본 발명의 범위 내에 있으므로 제공된 실시예에 의해 본 발명의 범위가 제한되어서는 안 된다. 본 명세서에 예시되고 설명된 것들 외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이며, 그 역시 뒤에 오는 청구의 범위에 속한다. 본 발명의 이점 및 목적은 본 발명의 각 실시태양에 반드시 반영되는 것은 아니다.

[0306] 본 출원에서 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 특허공개는 그 전체를 본 명세서의 내용에 포함시키기로 한다.

도면의 간단한 설명

[0044] 다음의 도면들은 예시의 목적으로만 제공된 것으로, 본 발명을 이해하거나 실시하는 데 필수적인 것은 아니다.

[0045] 도 1은 단독, IL-2 첨가, 또는 지시된 농도의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 인간 PBMC에서 유도된 IFN-α (pg/ml)의 양을 도시한 막대 그래프이다.

[0046] 도 2는 단독, IL-2 첨가, 또는 지시된 농도의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 인간 PBMC에서 유도된 MCP-1 (pg/ml)의 양을 도시한 막대 그래프이다.

[0047] 도 3은 단독, IL-2 첨가, 또는 지시된 농도의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 인간 PBMC에서 유도된 IP-10 (pg/ml)의 양을 도시한 막대 그래프이다.

[0048] 도 4는 단독 (N/A), 또는 1.0 μg/ml의 지시된 ODN의 존재하에 48 시간 배양한 후 인간 PBMC에서 유도된 IFN-α (pg/ml)의 양을 도시한 막대 그래프이다.

[0049] 도 5는 단독 (N/A), 또는 0.25 μg/ml (패널 A) 또는 1.0 μg/ml (패널 B)의 지시된 ODN의 존재하에 48 시간 배양한 후 CD86 (MFI)에 대한 B 세포의 표면 염색 결과를 도시한 한 쌍의 막대 그래프이다.

[0050] 도 6은 단독 (N/A), 또는 0.25 μg/ml (패널 A) 또는 1.0 μg/ml (패널 B)의 지시된 ODN의 존재하에서 행한 72 시간 B 세포 증식 분석의 결과 (cpm ³H-티미딘 흡수량)를 도시한 한 쌍의 막대 그래프이다.

[0051] 도 7은 단독 (N/A), 또는 0.25 μg/ml (패널 A) 또는 1.0 μg/ml (패널 B)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 인간 PBMC에서 유도된 IL-10의 양 (pg/ml)을 도시한 한 쌍의 막대 그래프이다. .

[0052] 도 8은 단독 (w/o), 또는 지시된 농도 (1 또는 6 μg/ml)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 두 공여체에게서 얻은 PBMC (D 127, 흑색 막대, 및 D124, 백색 막대)에서 유도된 IFN-α의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.

[0053] 도 9는 단독 (w/o), 또는 지시된 농도 (0.4, 1.0 또는 10.0 μg/ml)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 인간 PBMC 중 CD86 양성 세포의 백분율로 측정된 B 세포 활성화를 도시한 막대 그래프이다.

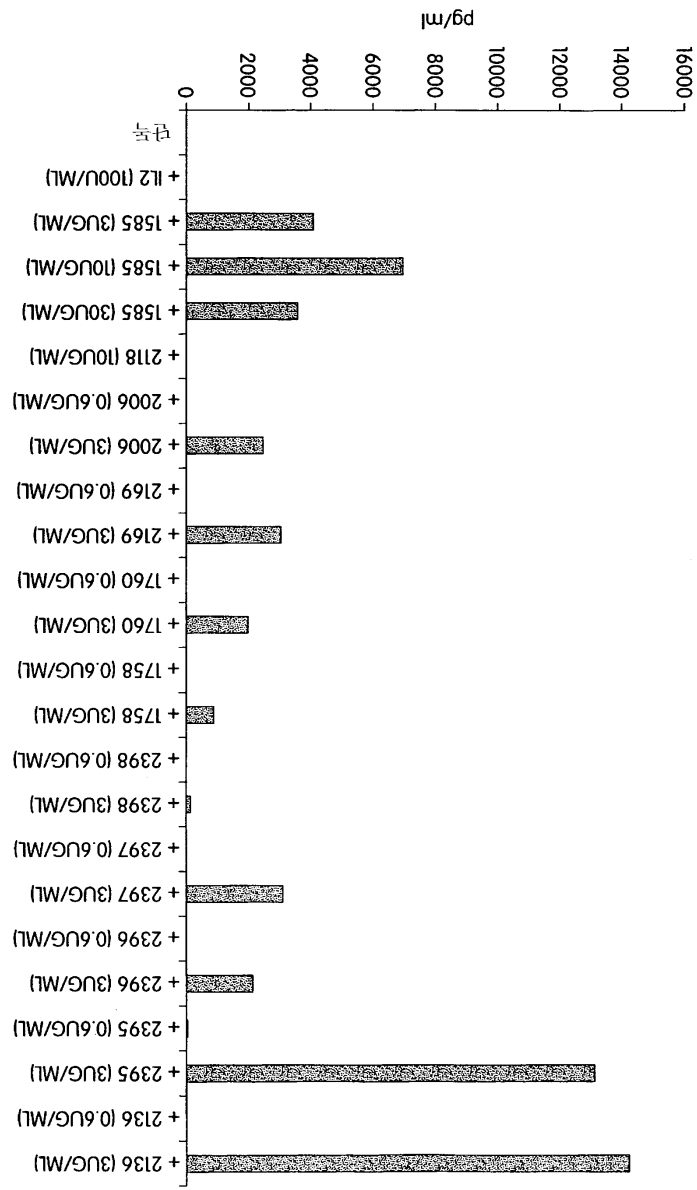
[0054] 도 10은 단독 (w/o), 또는 지시된 농도 (1 또는 6 μg/ml)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 두 공여체에게서 얻은 PBMC (D 141, 백색 막대, 및 D142, 흑색 막대)에서 유도된 IFN-α의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.

[0055] 도 11은 단독 (w/o), 또는 지시된 농도 (1 또는 6 μg/ml)의 지시된 ODN의 존재하에 48 시간 배양한 후 두 공여체에게서 얻은 PBMC (D 141, 백색 막대, 및 D142, 흑색 막대)에서 유도된 IFN-α의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.

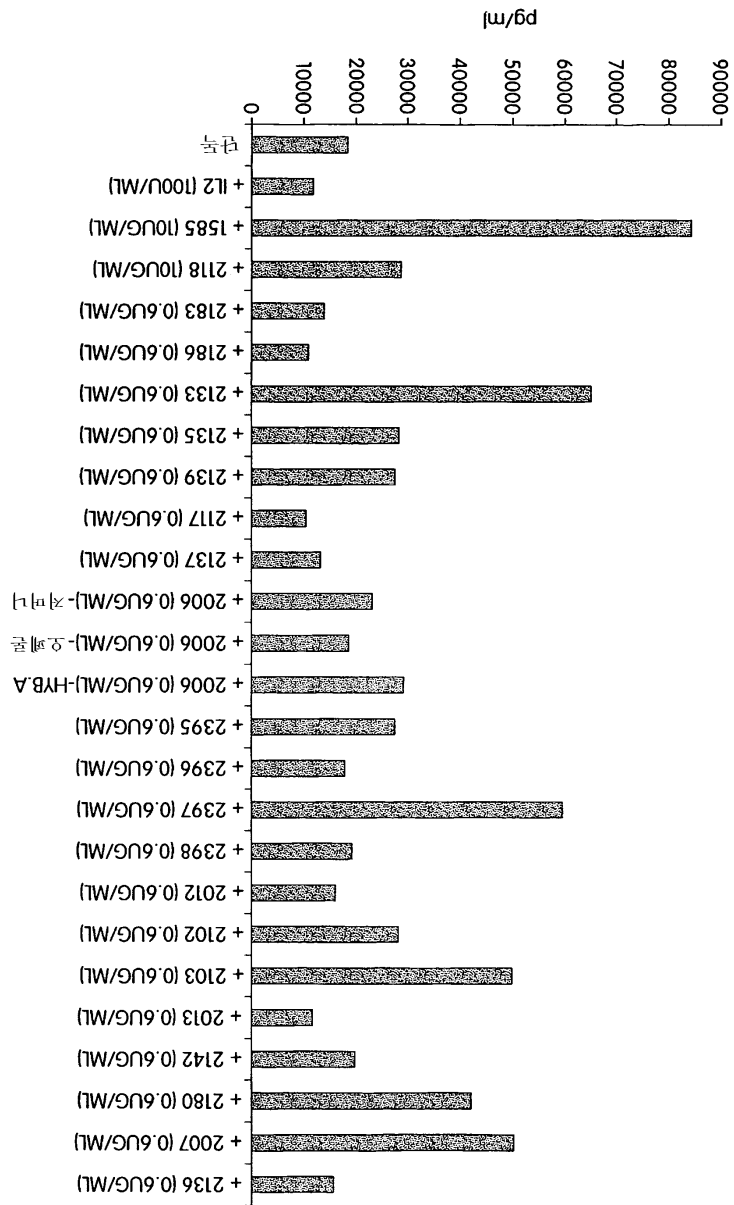
- [0056] 도 12는 단독 (w/o), 또는 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 두 공여체에게서 얻은 PBMC (D141, 빗금친 막대, 및 D142, 백색 막대)에서 유도된 IFN- α 의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다. .
- [0057] 도 13은 단독 (n/a), 또는 지시된 농도 (패널 A, B 및 C에서 각각 1, 3 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 PBMC에서 분비된 IFN- γ 의 양 (pg/ml)을 도시한 3개의 막대 그래프이다.
- [0058] 도 14는 단독 (NA), 또는 지시된 ODN의 존재하에서 48 시간 동안 배양한 후 IFN- γ 에 대해 양성인 CD3+ 세포의 백분율을 도시한 막대 그래프이다.
- [0059] 도 15는 단독 (NA), 또는 지시된 ODN의 존재하에서 48 시간 동안 배양한 후 T 세포의 IFN- γ 염색에서 평균 형광 강도 (MFI)를 도시한 막대 그래프이다.
- [0060] 도 16은 단독 (N/A), 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 인간 PBMC에서 분비하는 IFN- α 의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.
- [0061] 도 17은 단독 (w/o), 또는 지시된 농도 (1 또는 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 또는 48 시간 배양한 후 인간 PBMC에서 분비된 IFN- α 의 양 (pg/ml)을 도시한 한 쌍의 막대 그래프이다. 패널 A는 두 사람의 공여체에게서 모아서 합친 PBMC에 대한 결과를 도시한다. 패널 B는 두 사람의 공여체에게서 얻은 PBMC에 대한 결과 (D141 및 D142)를 도시한다.
- [0062] 도 18은 단독 (w/o), 또는 지시된 농도 (0.4 및 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 CD86-양성 B 세포의 백분율을 도시한 막대 그래프이다.
- [0063] 도 19는 단독, LPS 존재, 또는 지시된 농도 (0.2 내지 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 지시된 ODN의 존재하에 6 시간 (패널 A), 24 시간 (패널 B), 또는 48 시간 (패널 C) 배양한 후 인간 PBMC의 배양 상청액 중 IFN- γ 의 농도 (pg/ml)를 도시한 3개의 막대 그래프이다.
- [0064] 도 20은 두 명의 공여체에게서 얻은 백혈구를 단독 (w/o), 또는 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 혼합하는 2원 혼합 백혈구 반응 (MLR)에서 생성된 IFN- γ 의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.
- [0065] 도 21은 단독 (w/o), LPS 존재, 또는 지시된 농도 (0.2 내지 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 지시된 ODN의 존재하에 6 시간 (패널 A), 24 시간 (패널 B), 또는 48 시간 (패널 C) 배양한 후 인간 PBMC의 배양 상청액 중 IL-10의 농도 (pg/ml)를 도시한 3개의 막대 그래프이다.
- [0066] 도 22는 단독 (n/a), 또는 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (백색 막대) 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (흑색 막대)의 대조군 (IL-2, ODN 1585 (GGGGTCAACGTTGAGGGGGG, 서열 35) 및 ODN 2118 (GGGGTCAAGCTTGAGGGGGG, 서열 36)) 또는 여러가지 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 PBMC 상청액 중 IP-10의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.
- [0067] 도 23은 단독 (n/a), 또는 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (패널 A) 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (패널 B)의 대조군 (IL-2, ODN 1585 및 ODN 2118) 또는 여러가지 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 PBMC 상청액 중 IFN- α 의 양 (pg/ml)을 도시한 한 쌍의 막대 그래프이다.
- [0068] 도 24는 단독 (n/a), 또는 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (백색 막대) 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (흑색 막대)의 대조군 (IL-2, ODN 1585 및 ODN 2118) 또는 여러가지 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 PBMC 상청액 중 IFN- γ 의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.
- [0069] 도 25는 단독 (n/a), 또는 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (백색 막대) 또는 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (흑색 막대)의 대조군 (IL-2, ODN 1585 및 ODN 2118) 또는 여러가지 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 PBMC 상청액 중 IL-6의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.
- [0070] 도 26은 단독 (w/o), 또는 지시된 농도 (3.0 및 6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 지시된 ODN의 존재하에 24 시간 배양한 후 PBMC에서 분비된 IFN- α 의 양 (pg/ml)을 도시한 막대 그래프이다.

도면

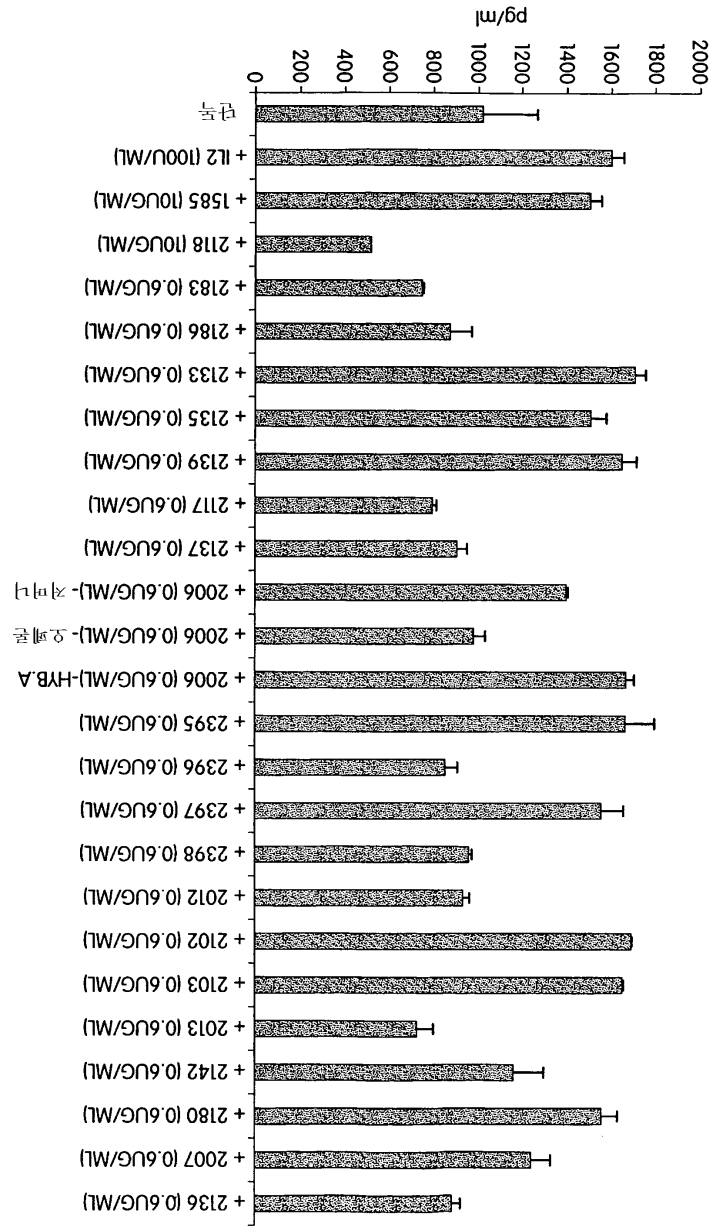
도면1



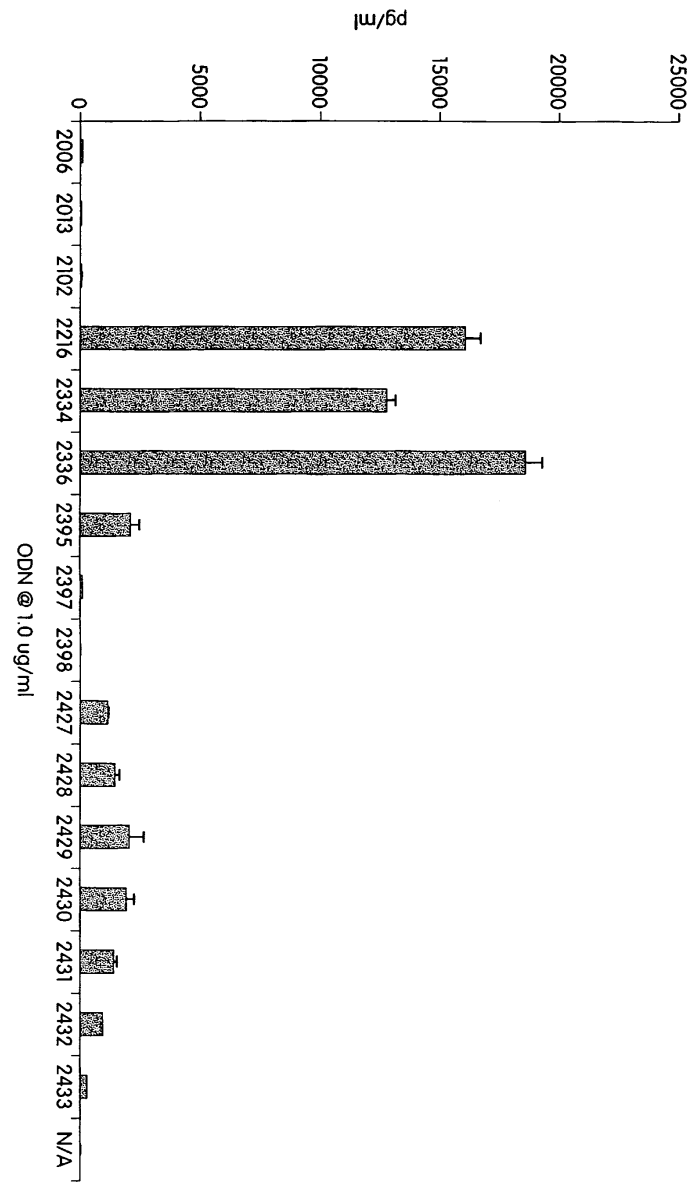
도면2



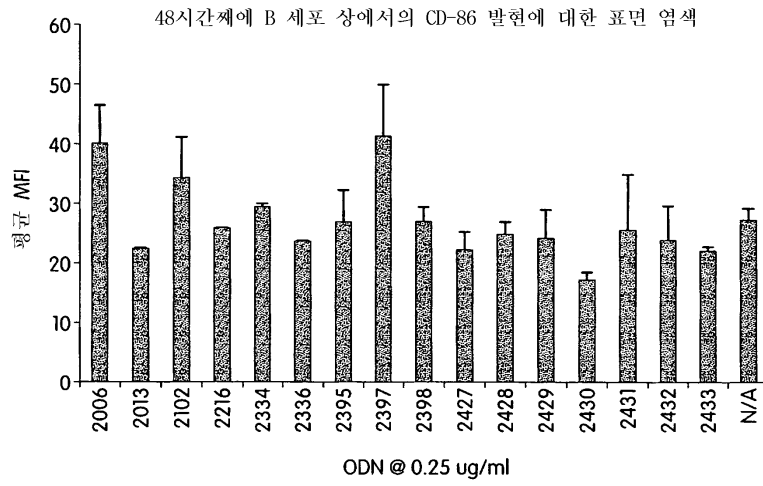
도면3



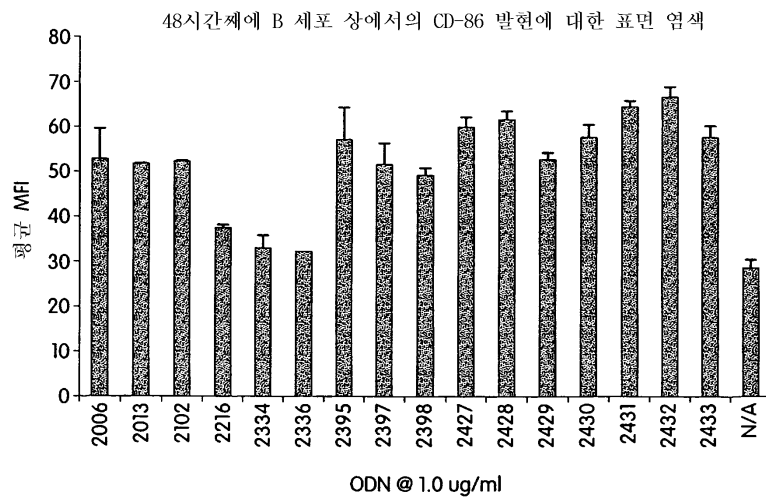
도면4



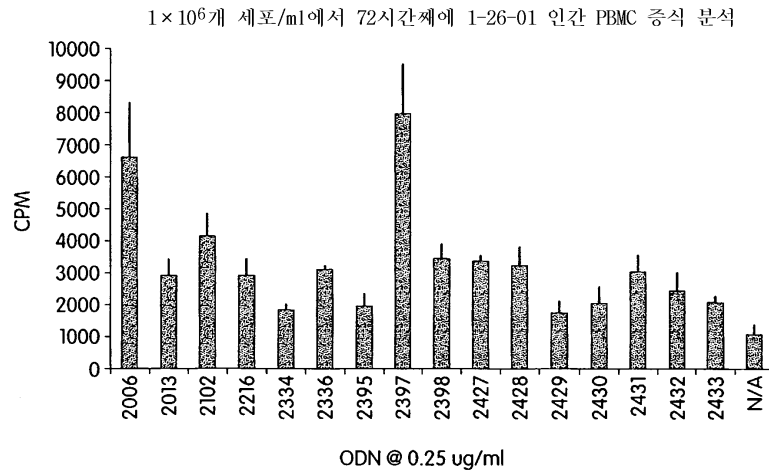
도면5A



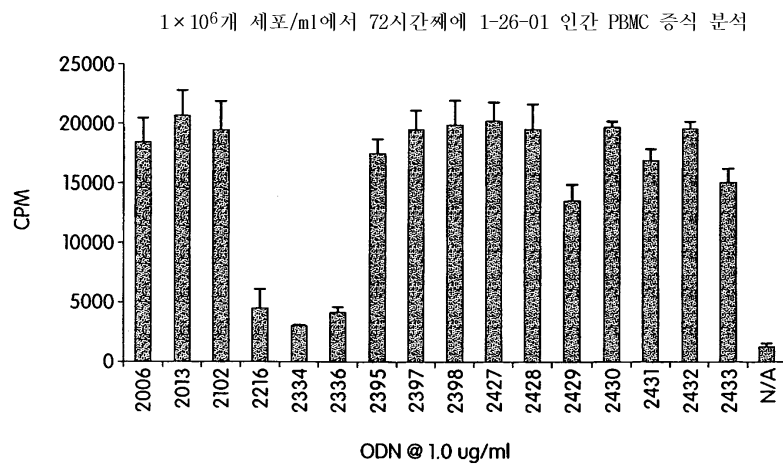
도면5B



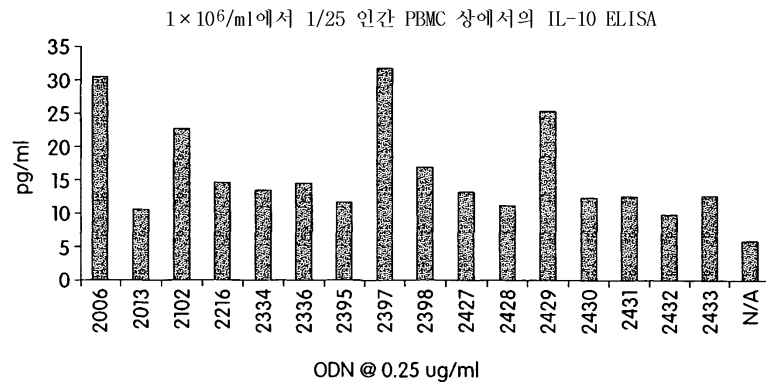
도면6A



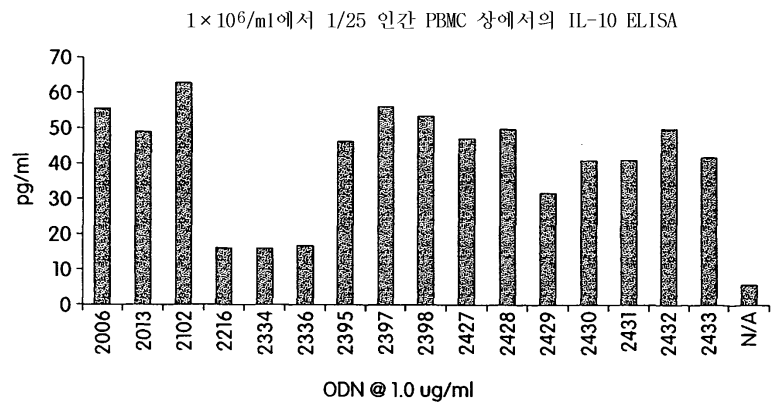
도면6B



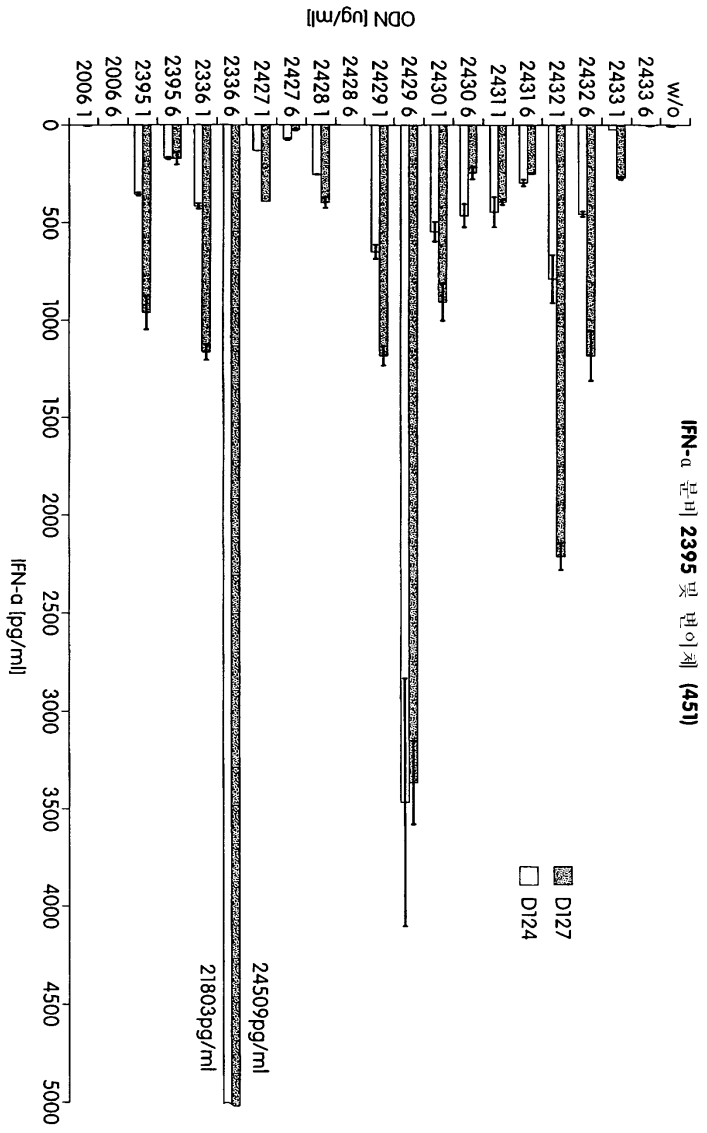
도면7A



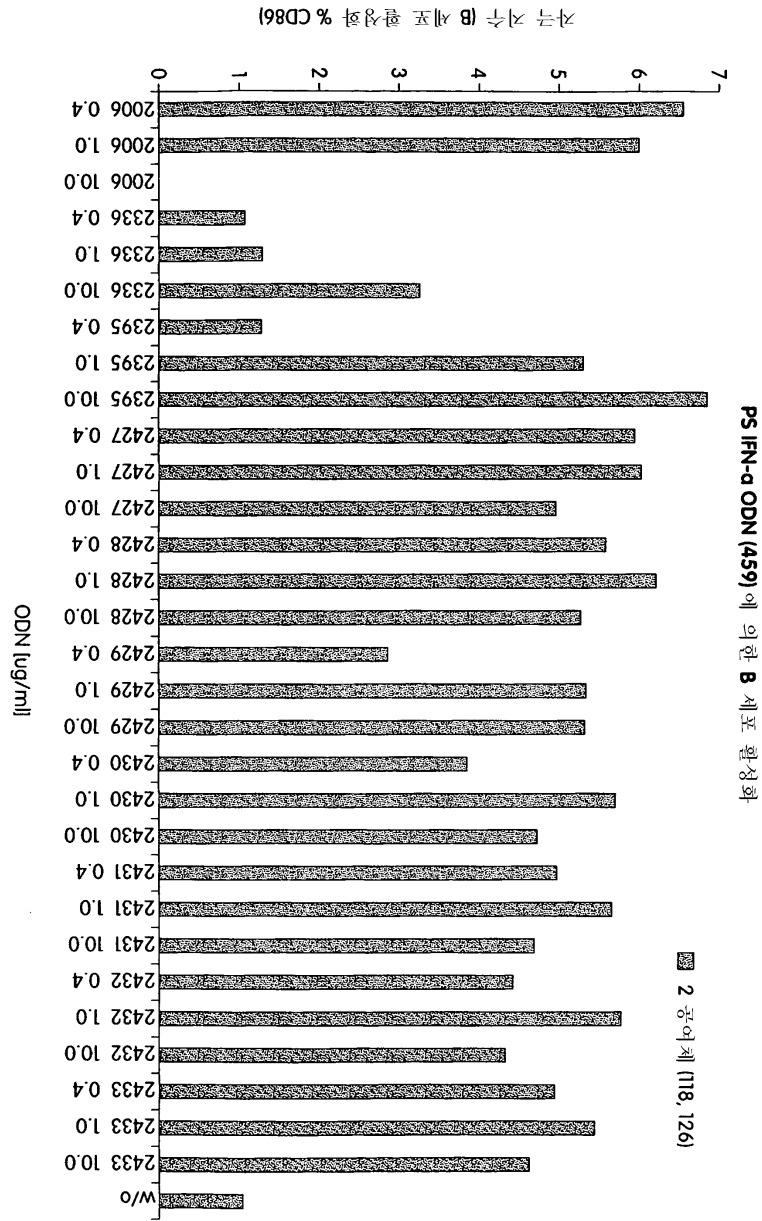
도면7B



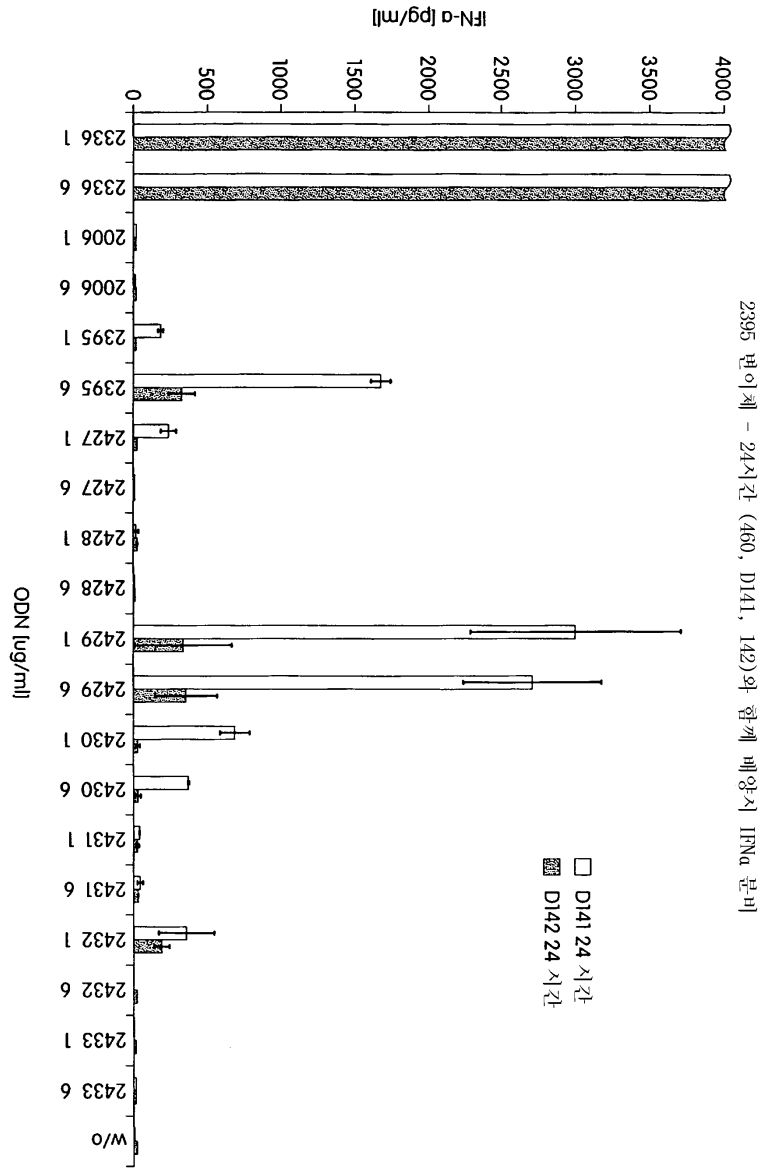
도면8



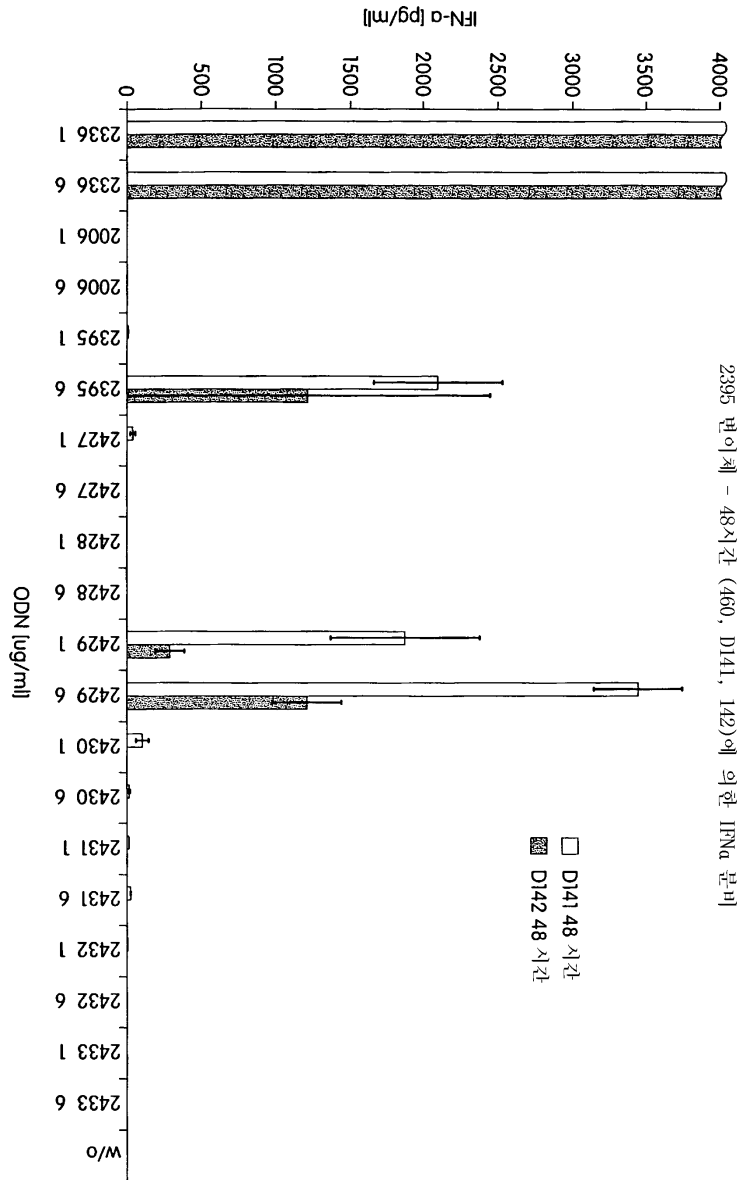
도면9



도면10

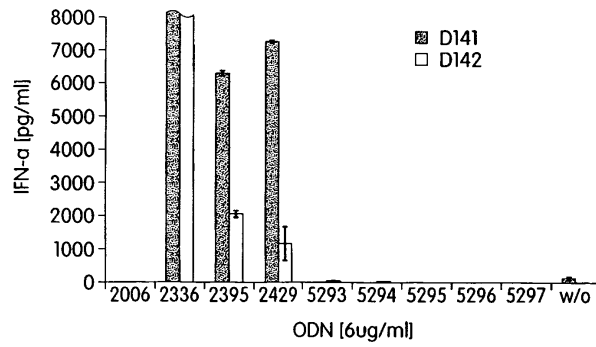


도면11

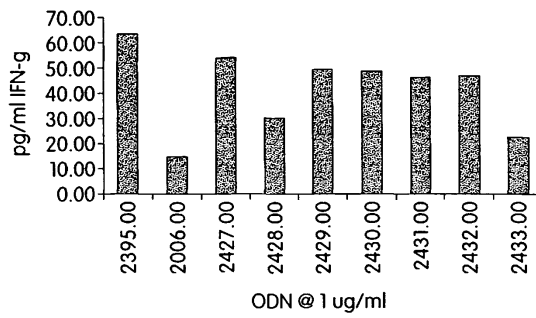


도면12

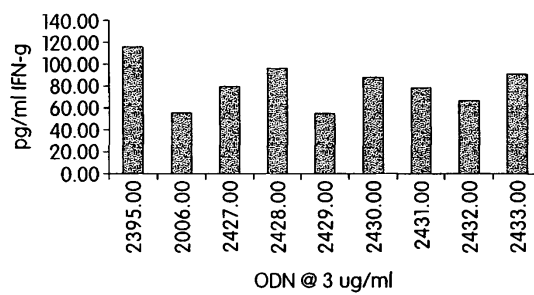
2395 변이체 (461) D141, 142에 의한 IFN α 분비



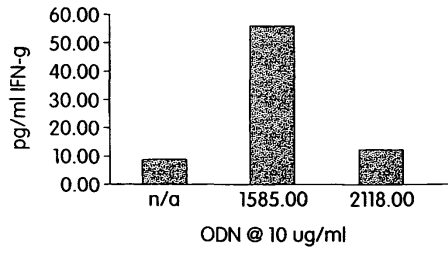
도면13A



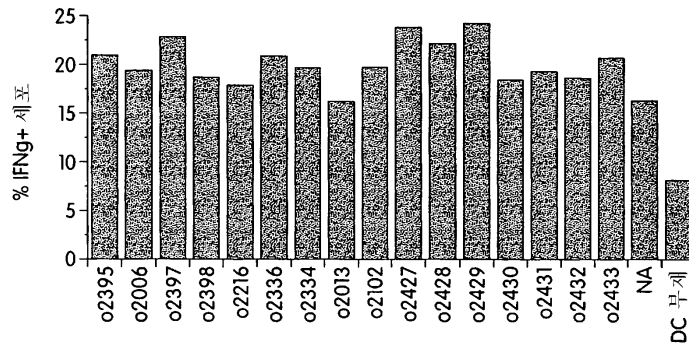
도면13B



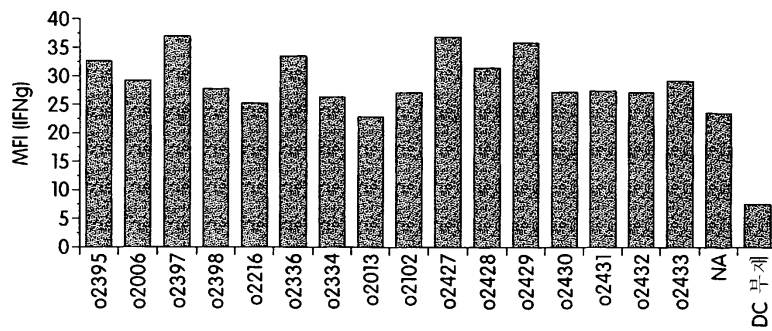
도면13C



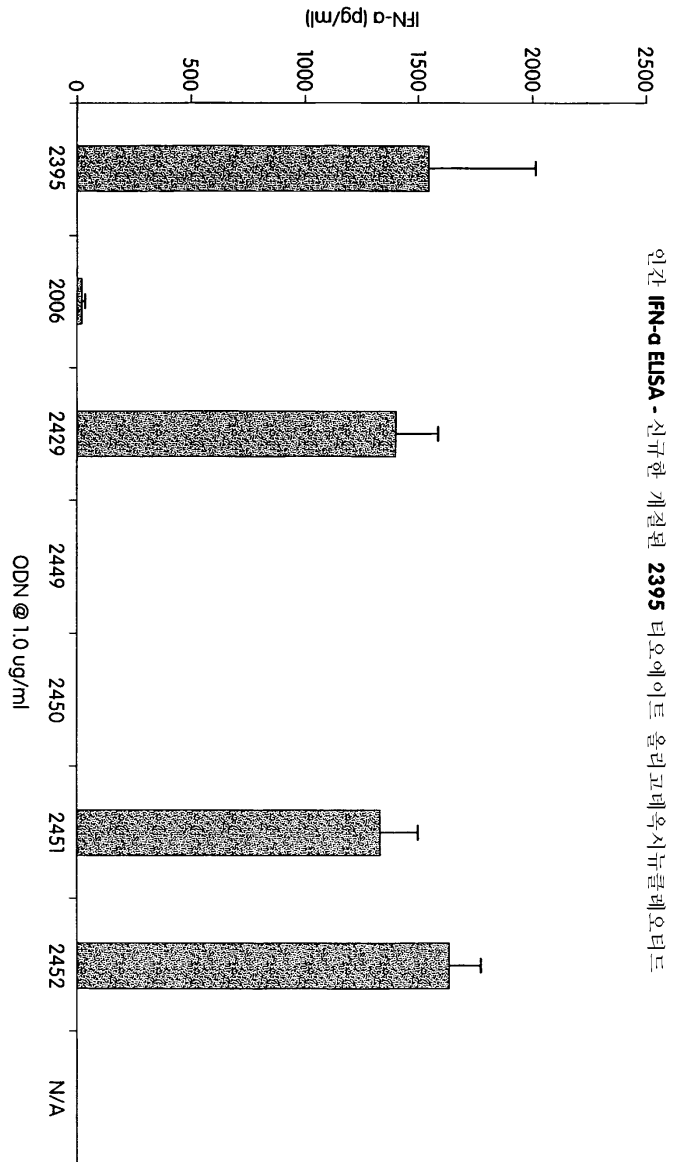
도면14



도면15



도면16



도면17A

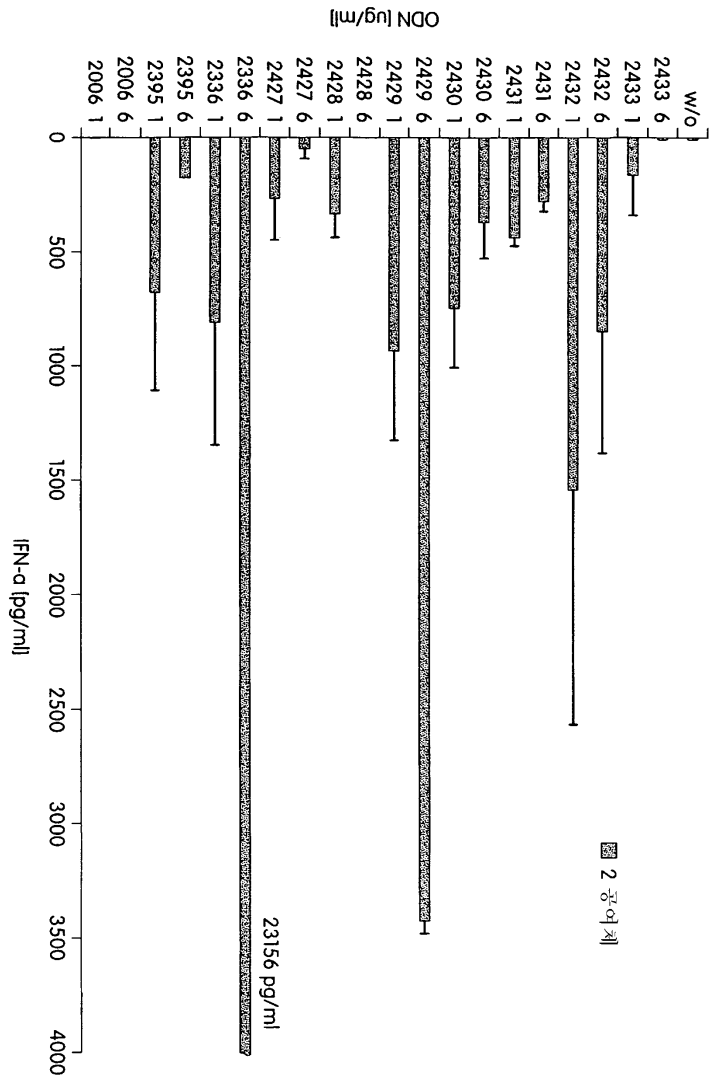
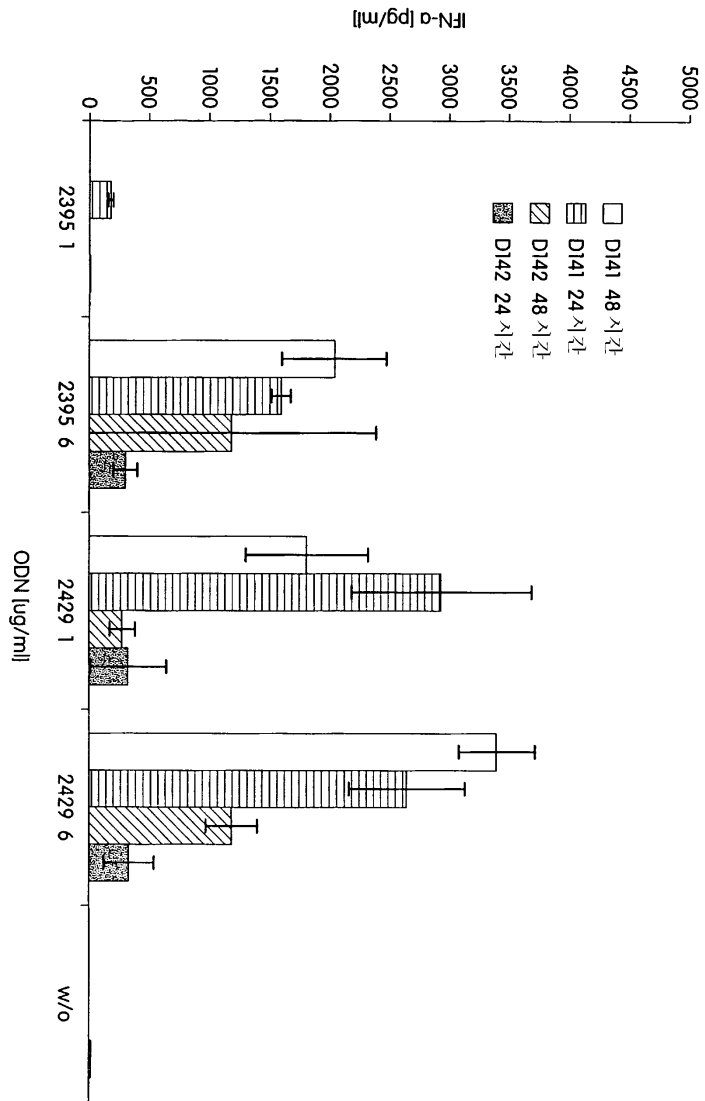
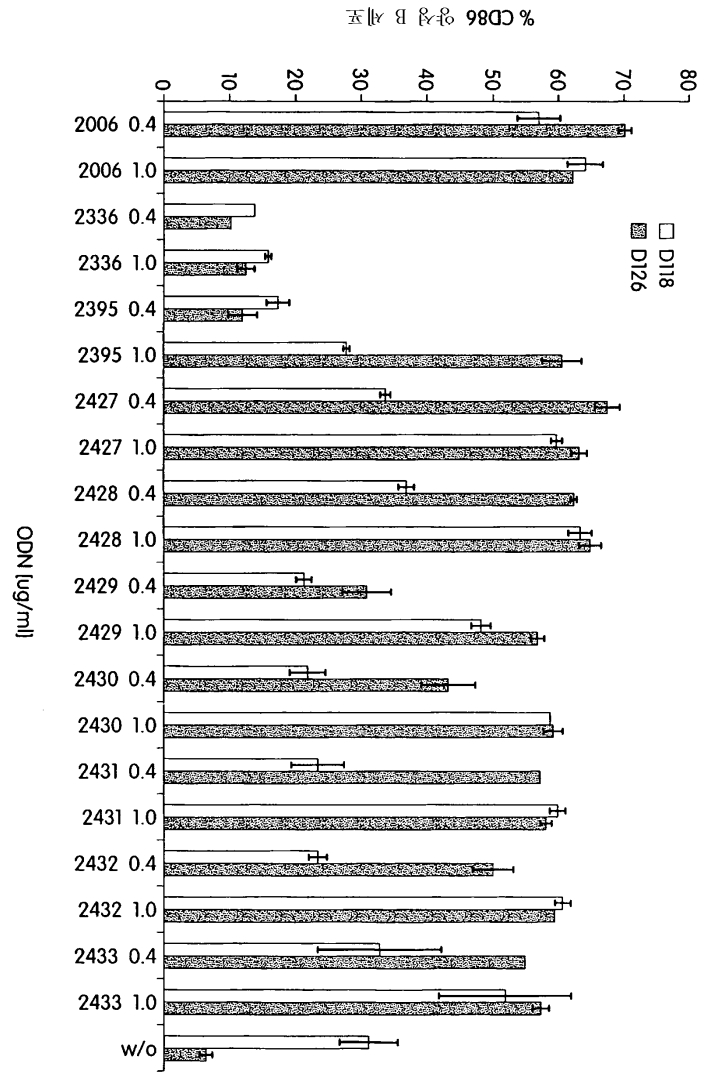


Figure 2

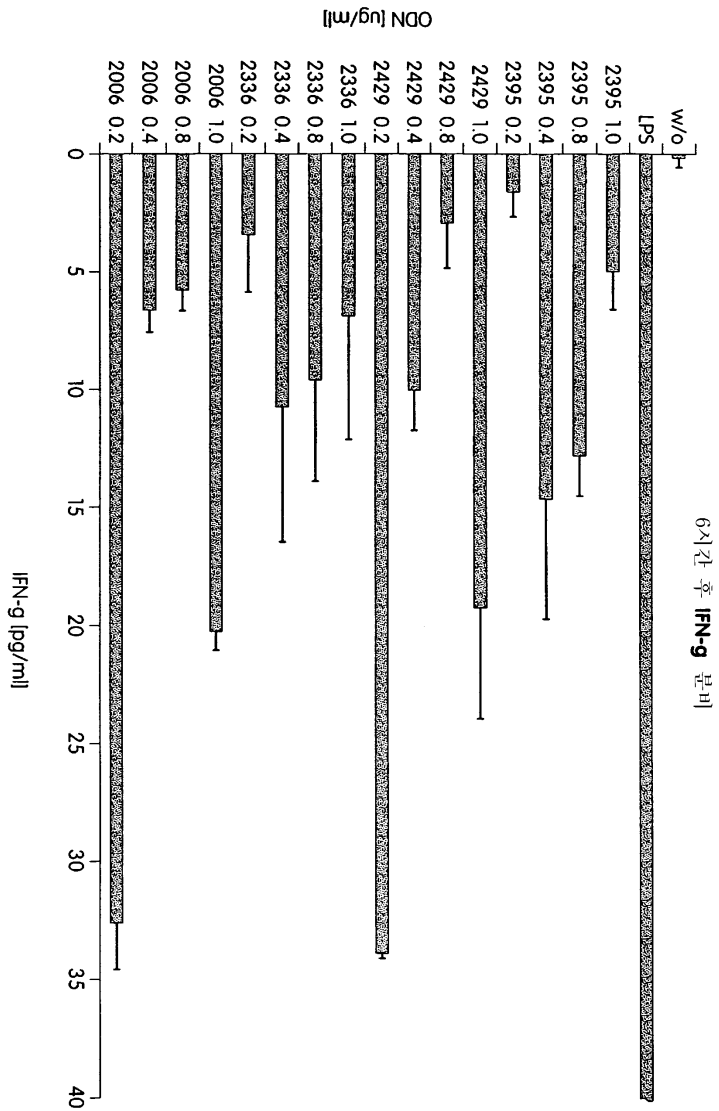
도면17B



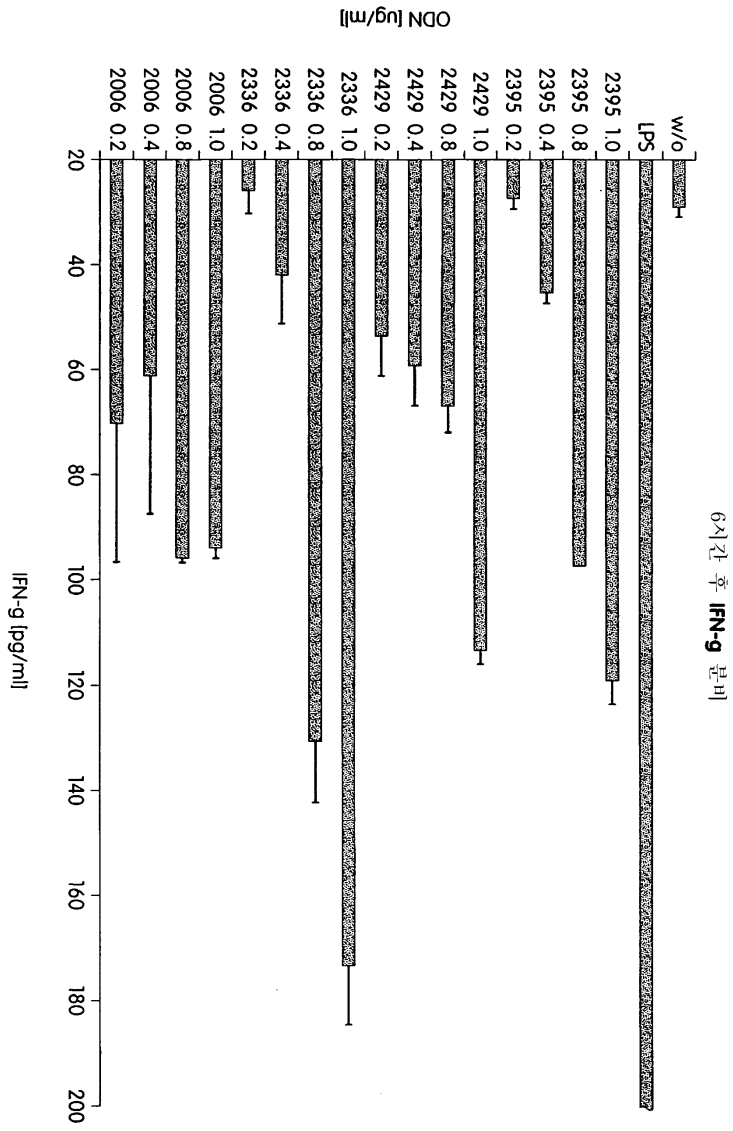
도면18



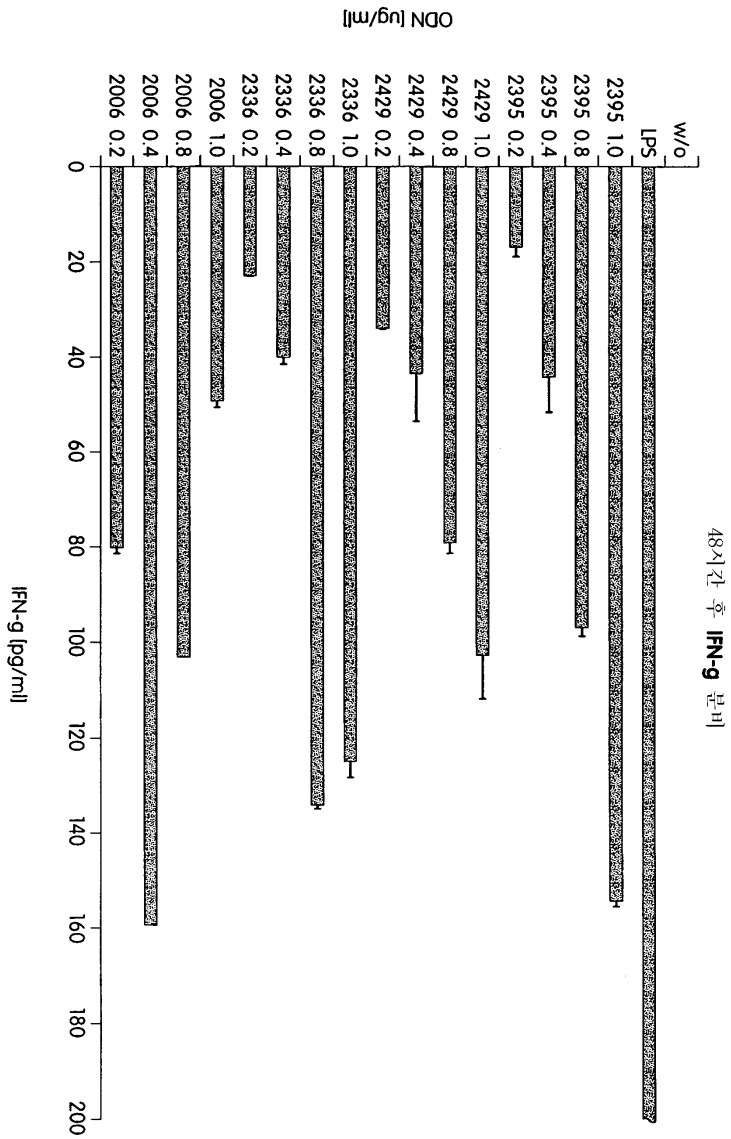
도면19A



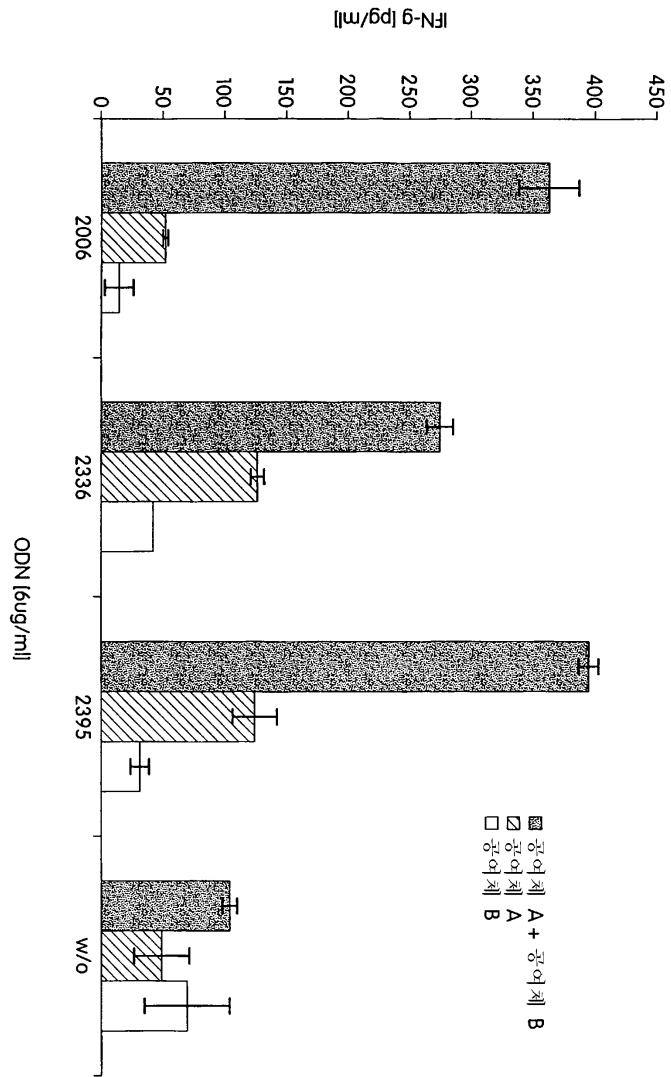
도면19B



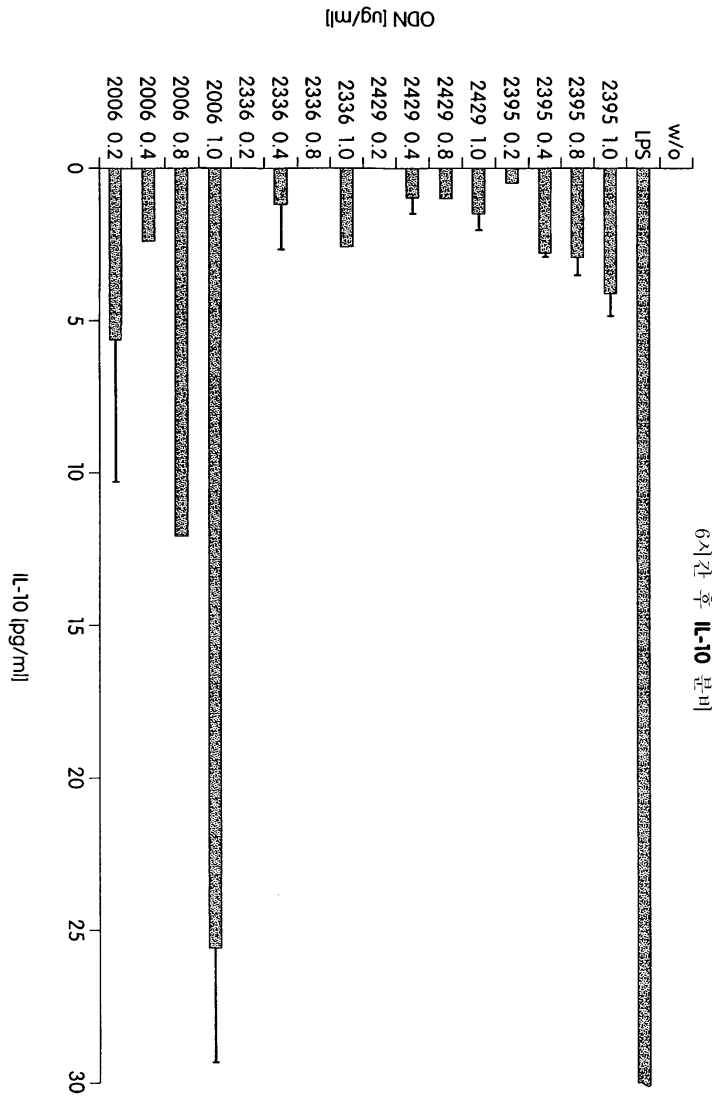
도면19C



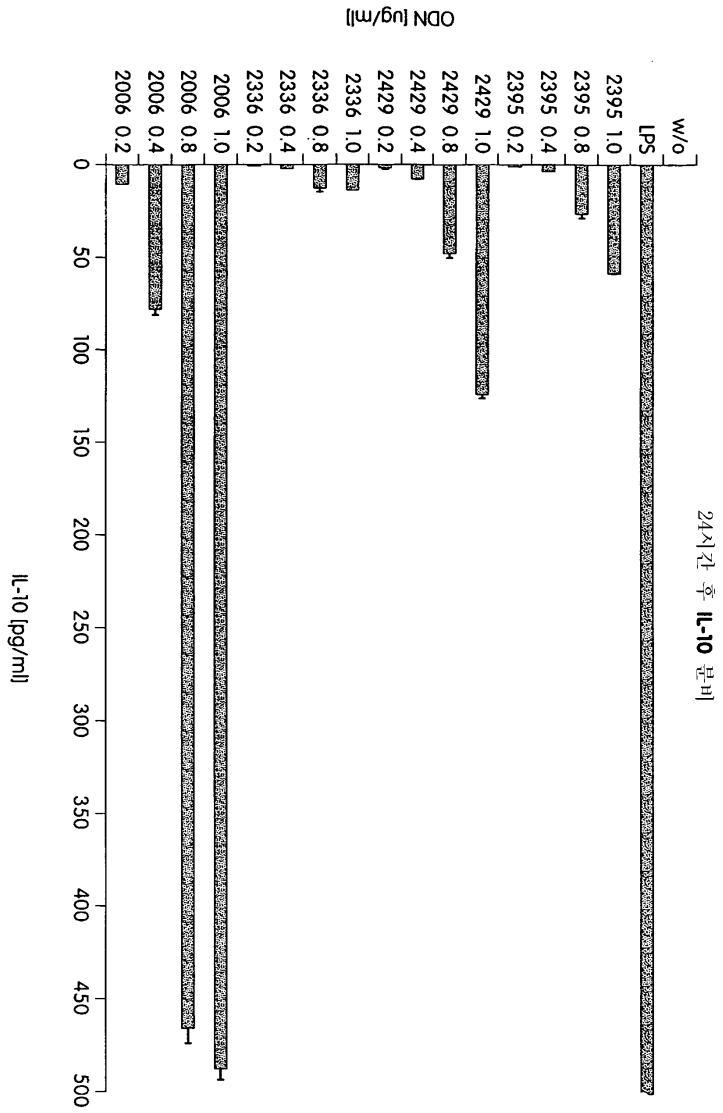
도면20



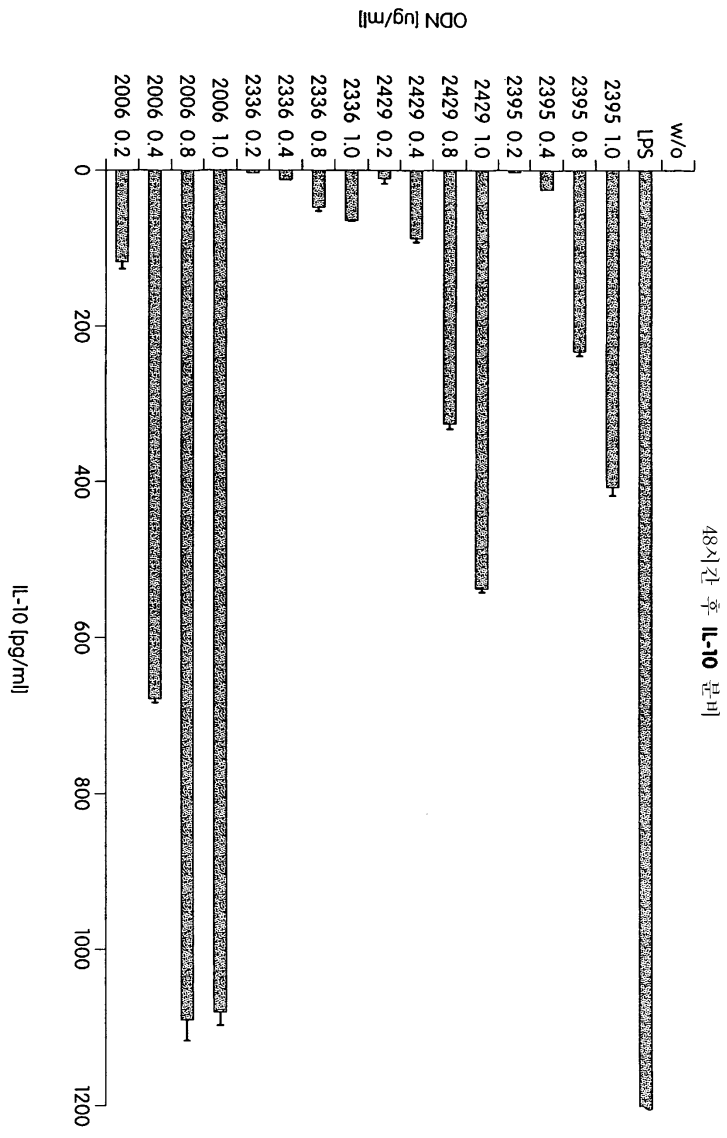
도면21A



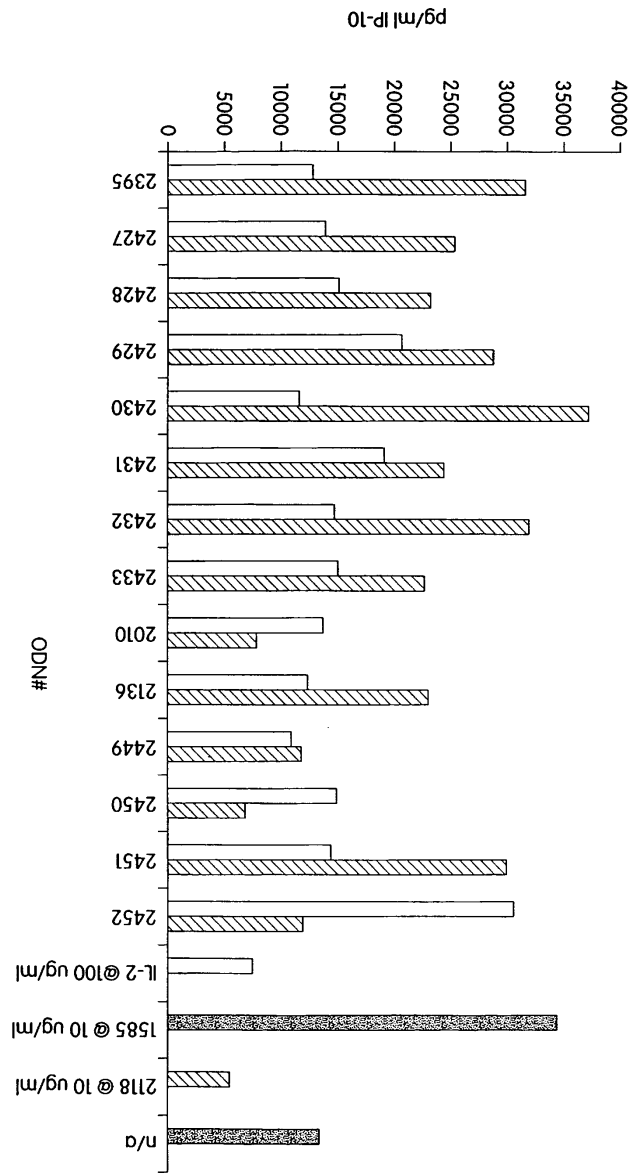
도면21B



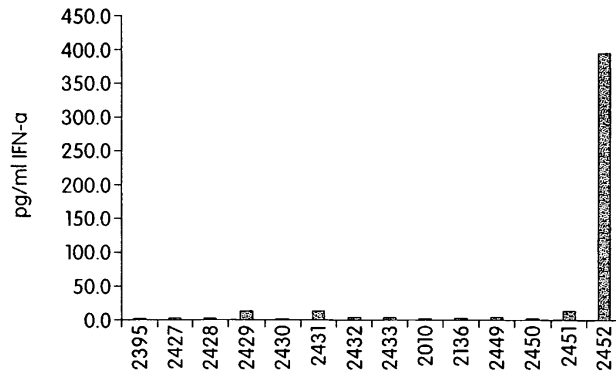
도면21C



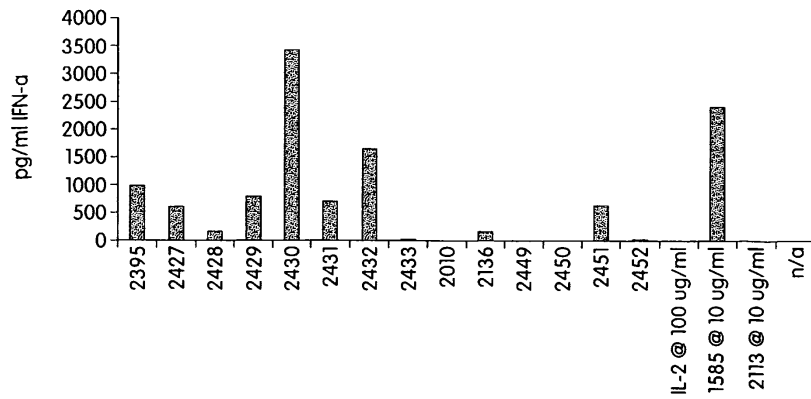
도면22



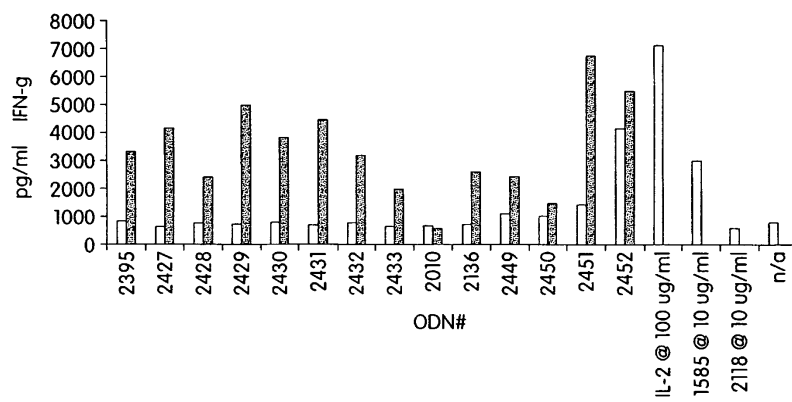
도면23A



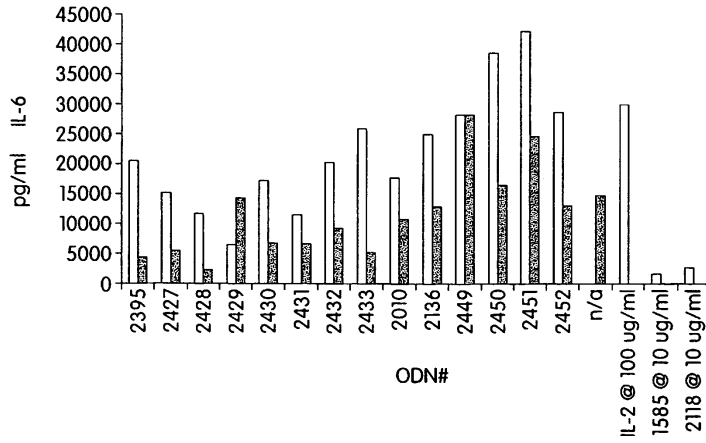
도면23B



도면24



도면25



도면26



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Coley Pharmaceutical Group Inc.
Coley Pharmaceutical GmbH
University of Iowa Research Foundation
- <120> Combination Motif Immune Stimulatory Oligonucleotides with Improved Activity
- <130> C01039/70063WO (HCL/AWS)
- <150> US 60/313,273
<151> 2001-08-17
- <150> US 60/393,952
<151> 2002-07-03
- <160> 81
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic Oligonucleotide
- <400> 1
tcgtcgtttt cggcgcgcgc cg 22
- <210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 2
tcgtcgtttt cgtcgcgcgc cg 22

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 3
tcgtcgtttt cgtcgcgcgg cg 22

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 4
tcgtcgtttt cggcgcgccg cg 22

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 5
tcgtcgtttt cggcgcgccg cg 22

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 6

tcgtcgtttt cggcggcgc cg

22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 7

tcgtcgtttt cggcccgcgc gg

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 8

tcgtcgtttt cggccgcgc gg

22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 9

tcgtcgtttt cgggggccc cc

22

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 10

tcgtcgtttt cccccgggg gg 22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 11

tcggcgcgcg ccgtcgtcgt tt 22

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 12

tcgtcgtttt cggcgcgcgc cgttttt 27

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 13

tcctgacgtt cggcgcgcgc cg 22

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>

<221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n = 5-methylcytosine

<400> 14

tngtngtttt nggngngngn ng

22

<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 15
tgctgctttt cgcgcgcgcg cg 22

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 16
tcgtcgtttt cgcgcgcgcg cg 22

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 17
tcgtcgttgg ttgtcgtttt ggtt 24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 18
 accatggacg agctgtttcc cctc 24

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 19
 tcctgacgtt cggcgcgcgc cc 22

<210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 20
 tgctgctttt gtgcttttgt gctt 24

<210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 21
 tcgtcgtttc gtcgttttga cggt 24

<210> 22
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 22

tcgcgtcgt tttgtcgttt tgacgtt

27

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 23

cggcgcgcgc cg

12

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 24

cggcgcgcgc cgcggcgcgc gccg

24

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 25

cggcgcgcgc cgtcgtcggtt t

21

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 26

tcggcgcgcg ccgtgctgct tt

22

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 27

ccgccgtttt cggcgcgcgc cg

22

<210> 28

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 28

cggcggccgc cg

12

<210> 29

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 29

cggcgcgcgc cg

12

<210> 30
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 30
gcgcgcgcg gc 12

<210> 31
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 31
ccccccgggg gg 12

<210> 32
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 32
ggggggcccc cc 12

<210> 33
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 33

ccccccggggg 10

<210> 34
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 34
 gggggccccc 10

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 35
 ggggtcaacg ttgagggggg 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 36
 ggggtcaagc ttgagggggg 20

<210> 37
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 37

cggcgcgcgc cc

12

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 38

gcggcgggcg gcgcgcgcc

20

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 39

tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt

24

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 40

tctcccagcg tgcgcat

18

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 41

ataatcgacg ttcaagcaag

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 42

tctatcgacg ttcaagcaag

20

<210> 43

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 43

tcgtcgtttt tgtcgttttt gtcggt

26

<210> 44

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 44

tcgtcgtttt gtcgtttttg tcgttt

26

<210> 45

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 45
 ttcgtgtttt cgtgttttcg tcgt 24

<210> 46
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 46
 tcgtcgttgt cgttttgcg tt 22

<210> 47
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n = inosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n = inosine

<400> 47
 tcntentttt 10

<210> 48

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 48
tgtcgttgtc gttgctgttg tcgtt 25

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 49
tcgtcgtttt gacgttttgc cgtt 24

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 50
tcgtcgtttt gacgttttga cgtt 24

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature

<222> (2)..(2)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n = 5-methylcytosine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n = 5-methylcytosine

<400> 51
 tngtngtttt gtngttttgt ngtt 24

<210> 52
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 52
 tcgtcgtttt ttgtcgtttt ttgtcgtt 28

<210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 53
 tttttttttt tttttttttt tttt 24

<210> 54
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 54
tcgtcgtgt ctccgttct tcttgcc 27

<210> 55
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 55
gggggacgat cgtcggggg 19

<210> 56
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 56
ggggtcgacg tcgacgtcga gggggggg 27

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 57

ggggacgacg tcctgggggg g 21

<210> 58
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 58
 tcgtcgtttt cggcggccgc c 21

<210> 59
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 59
 tcgtcgtttt cggccgccgc c 21

<210> 60
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 60
 tcgtcgtttt cggccgccgc cg 22

<210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 61

tcgtcgtttt cgccgccgcc g

21

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 62

tgctgctttt cggcggccgc cg

22

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> n = inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> n = inosine

<400> 63

tngtngtttt cggcggccgc cg

22

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 64

tcgtcgtttt cggcggccga cg

22

<210> 65

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 65

tcgtcgtttt cgtcggccgc cg

22

<210> 66

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 66

tcgtcgtttt cgacggccgc cg

22

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 67

tcgtcgtttt cggcggccgt cg

22

<210> 68

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 68

cgacgatcgt cg

12

<210> 69

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 69

cgacgtacgt cg

12

<210> 70

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n = inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> n = inosine

<400> 70

tcntcntttt cggcggccgc cg

22

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 71

tcgtcgtttc gacggccgtc g

21

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 72

tcgtcgtttc gacgatcgtc g

21

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 73

tcgtcgtttc gacgtacgtc g

21

<210> 74

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 74

tcgtcgcgac ggccgtcg

18

<210> 75
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 75
 tcgtcgcgac gatcgtcg 18

<210> 76
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 76
 tcgtcgcgac gtacgtcg 18

<210> 77
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 77
 tcgtttttt cgacggccgt cg 22

<210> 78
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 78

tcgttttttt cgacgatcgt cg 22

- <210> 79
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 79
tcgttttttt cgacgtacgt cg 22

- <210> 80
- <211> 12
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 80
cgacgttcgt cg 12

- <210> 81
- <211> 13
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 81
cggcgcctg ccg 13